



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Caracterización fisicoquímica de complejos de inclusión β -
ciclodextrina/aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*)
incorporados a nanopartículas poliméricas

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta:

Ing. Sandra Colchado Morales

Dirigido por:

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Santiago de Querétaro, Qro., Diciembre de 2014



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Caracterización fisicoquímica de complejos de inclusión β - ciclodextrina/aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*) incorporados a nanopartículas poliméricas

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Ing. Sandra Colchado Morales

Dirigido por:

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

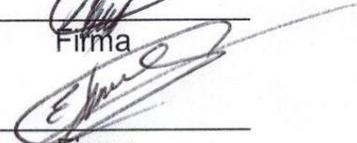
Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Presidente


Firma

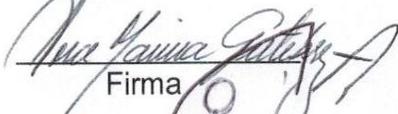
Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Secretario


Firma

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva
Vocal


Firma

Dr. Dora Marina Gutiérrez Avella
Suplente


Firma

Dr. Luis Arturo Godínez Mora- Tovar
Suplente


Firma


M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

El aceite esencial (AE) de orégano es utilizado como aditivo en la industria alimentaria por sus propiedades antioxidantes y antibacterianas. El objetivo de este trabajo fue la caracterización físicoquímica de complejos de inclusión β -ciclodextrina/aceite esencial (CI β -CD/AE) de orégano (*Lippia graveolens*) incorporados a nanopartículas poliméricas (NPs). Se elaboraron CI β -CD/AE en cuatro proporciones (95:5, 90:10, 85:15 y 80:20 p/p) por el método de coprecipitación. La eficiencia de encapsulación de los CI β -CD/AE alcanzó un máximo de 95.19% en el tratamiento 90:10, tratamiento seleccionado para la doble encapsulación. Las NPs se prepararon a través del método de desplazamiento del solvente, usando Eudragit L30-D55, como material de pared. La Voltamperometría Diferencial de Pulso (VDP) arrojó un desplazamiento positivo en el potencial de oxidación para CI β -CD/AE (637 mV) y NPs (754 mV) respecto al AE (590 mV). En Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), se presentó un desplazamiento hacia temperaturas de fusión mayores. Tanto la VDP como DSC, Infrarrojo y Difracción de Rayos X, confirmaron la formación de los CI y NPs. Micrografías mostraron diámetros medios de las NPs de 133 nm. El perfil de liberación del AE evaluado con VDP a tres pH's diferentes (2, 4.5 y 7.2) de 0 a 32 h, el porcentaje de liberación máximo del AE para los complejos fue a pH 2 (85%), mientras que de las NPs fue a pH 7.2 (47.9- 75.4 %), liberado de manera progresiva. La capacidad antioxidante evaluada con una cinética de 90 minutos a pH 2, 4.5 y 7.2 por ABTS y VDP fue mayor al pH 7.2 para todos los tratamientos. Al minuto 90, para el AE, CI β -CD/AE, y NPs se obtuvo una capacidad antioxidante de 590, 602.8 y 436.4 μ moles equivalente de trolox/mg, respectivamente. Estos resultados confirmaron que la capacidad antioxidante se conserva después de la encapsulación; además con la doble encapsulación se tiene una liberación más controlada.

(Palabras clave: aceite esencial, orégano, β - ciclodextrinas, complejos de inclusión, nanopartículas poliméricas)

SUMMARY

Essential oil (EO) of oregano is used as additive in the food industry for its antioxidant and anti-bacterial properties. The aim of this work was the physicochemical characterization of inclusion complexes of β -cyclodextrin/essential oil (CI β -CD/EO) oregano (*Lippia graveolens*) incorporated into polymeric nanoparticles (NPs). Were developed CI β -CD/EO four ratios (95:5, 90:10, 85:15 and 80:20 w/w) by the co-precipitation method. The encapsulation efficiency of CI β -CD/EO peaked at 95.19% in 90:10 treatment selected for the double encapsulation. The NPs were prepared via the solvent displacement method using Eudragit L30-D55. Differential Pulse Voltammetry (VDP) showed a positive shift in the oxidation potential for CI β -CD/OE (637 mV) and NPs (754 mV) compared to AE (590 mV). In Differential Scanning Calorimetry (DSC), a shift to higher melting temperatures is presented. Both the VDP as DSC, IR and X-ray diffraction, confirmed the formation of the CI and NPs. Micrographs showed mean diameters of NPs of 133 nm. The release profile of EO evaluated by VDP at three different pHs (2, 4.5 and 7.2) from 0 to 32 h, the percentage of maximum release for complex EO was at pH 2 (85%) h, while the NPs was at pH 7.2 (47.9- 75.4%), released progressively. Antioxidant capacity kinetics evaluated 90 minutes at pH 2, 4.5 and 7.2 by VDP ABTS was higher at pH 7.2 for all treatments. At 90 minutes, for EO, CI, and NPs antioxidant capacity of 590, 602.8 and 436.4 μ mol of trolox equivalent/mg, respectively, was obtained. These results confirmed that the antioxidant capacity is retained after encapsulation; also with the double encapsulation it has a controlled release.

(Keywords: essential oil, oregano, β - cyclodextrin, inclusion complexes, polymeric nanoparticles)

**A mi FAMILIA, lo más sagrado que tengo,
y a Pedro Camacho con todo mi amor.**

Si hay voluntad, hay forma...

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme concluir esta meta, por colocar pruebas de enseñanza en el camino.

Al Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República de la Universidad Autónoma de Querétaro, por abrirme sus puertas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Sandra Mendoza, por su tiempo, apoyo y facilidades otorgadas para la realización de esta investigación.

A los miembros de mi comité: la Dra. Rosalía Reynoso Camacho, el Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva, la Dra. Dora Marina Gutiérrez Avella y el Dr. Luis Arturo Godínez Mora- Tovar, por sus valiosas aportaciones y tiempo dedicado a este trabajo.

A ti mami, por ser una luz en mi vida, mi confidente, ese ángel que me guía, por todo el apoyo, cariño y dedicación. A mi padre, por cada palabra de aliento, por estar pendiente de cada paso que doy.

A Pedro Camacho, por todo tu apoyo, paciencia, comprensión y amor, por ser esa fuerza que me mantiene de pie, por estar siempre a mi lado, por apoyarme en cada locura que emprendo, simplemente porque eres un gran esposo. TE AMO.

A mis hermanos:

Norma: Porque eres el ingrediente de fortaleza.

Daniel: Porque eres un ejemplo de lucha para salir adelante.

Gilberto: Porque te apasionas por tu trabajo.

Samuel: Porque tu entusiasmo y alegría siempre nos contagia.

Gloria: Porque eres ejemplo de perseverancia y superación.

Diego: Por esa ternura que inspiras.

Karina: Porque eres solidaria, un apoyo siempre.

Porque cada uno es pieza fundamental para los engranes de armonía familiar.

A mis cuñad@s y sobrinos, porque son parte de nuestras vidas.

Al Dr. Porfirio Ramírez Vallejo (QEPD), el mejor investigador, quien siempre tendrá mi más profunda admiración y cariño, quien me enseñó el verdadero sentido de amar lo que se hace.

A Bety Gómez, por ser esa amiga incondicional, por las peripecias compartidas, pero sobre todo por enseñarme el valor de la verdadera amistad.

Al niño, Adrián Cruz, por ser mi mejor amigo, y a pesar del tiempo y la distancia has formado parte de mi vida.

Al personal administrativo, especialmente a Carmelita y Laurita, quienes con su ejemplo y dedicación transmiten el amor por su trabajo.

A mis compañeros de generación 2012-2014, por las experiencias compartidas.

A todos mi más sincero agradecimiento...

Contenido

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2 | ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 | SISTEMAS DE ENCAPSULACIÓN Y LIBERACIÓN CONTROLADA..... | 3 |
| 2.2 | MATERIALES PARA LA ENCAPSULACIÓN..... | 3 |
| 2.2.1 | <i>Ciclodextrinas (CD)</i> | 4 |
| 2.2.2 | <i>Regulación de las ciclodextrinas</i> | 5 |
| 2.3 | COMPLEJOS DE INCLUSIÓN | 5 |
| 2.3.1 | <i>Técnicas para la formación de complejos</i> | 6 |
| 2.3.2 | <i>Aplicaciones de los complejos de inclusión</i> | 8 |
| 2.4 | TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN | 9 |
| 2.4.1 | <i>Microscopía Electrónica de Barrido</i> | 11 |
| 2.4.2 | <i>Difracción de Rayos X</i> | 11 |
| 2.4.3 | <i>Espectroscopía de Infra-Rojo</i> | 11 |
| 2.4.4 | <i>Electroquímica</i> | 12 |
| 2.4.5 | <i>Calorimetría</i> | 12 |
| 2.4.6 | <i>Perfil de liberación</i> | 12 |
| 2.5 | DOBLE ENCAPSULACIÓN..... | 14 |
| 2.6 | NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS (NP's)..... | 14 |
| 2.6.1 | <i>Eudragit</i> | 15 |
| 2.7 | CAPACIDAD ANTIOXIDANTE | 18 |
| 2.7.1 | <i>Técnicas para la determinación de capacidad antioxidante</i> | 19 |
| 2.8 | ORÉGANO MEXICANO (<i>LIPPIA GRAVEOLENS</i>)..... | 22 |
| 3 | HIPÓTESIS..... | 26 |
| 4 | JUSTIFICACIÓN..... | 26 |
| 5 | OBJETIVOS..... | 27 |
| 5.1 | OBJETIVO GENERAL: | 27 |
| 5.2 | OBJETIVOS PARTICULARES: | 27 |
| 6 | METODOLOGÍA | 28 |
| 6.1 | MATERIALES..... | 28 |
| 6.2 | MÉTODOS..... | 28 |

| | | |
|-------|---|----|
| 6.2.1 | <i>Extracción de aceite esencial por hidrodestilación</i> | 29 |
| 6.2.2 | <i>Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas</i> | 30 |
| 6.2.3 | <i>Preparación de los complejos de inclusión β-CD/timol y β-CD/AE</i> | 31 |
| 6.2.4 | <i>Preparación de las nanopartículas poliméricas</i> | 32 |
| 6.2.5 | <i>Caracterización fisicoquímica</i> | 33 |
| 7 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 40 |
| 7.1 | OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO. | 40 |
| 7.2 | COMPLEJOS DE INCLUSIÓN B- CD/TIMOL Y B- CD/AE | 41 |
| 7.3 | CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) | 41 |
| 7.4 | DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)..... | 43 |
| 7.5 | ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADAS DE FOURIER MEDIANTE REFLECTANCIA DIFUSA (DRIFT)..... | 47 |
| 7.6 | VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE PULSO (VDP)..... | 51 |
| 7.6.1 | <i>Eficiencia de encapsulación (EE%)</i> | 53 |
| 7.7 | PERFILES DE LIBERACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN B-CD/AE (PROPORCIÓN 90:10) | 54 |
| 7.8 | CAPACIDAD ANTIOXIDANTE | 55 |
| 7.8.1 | <i>Método ABTS</i> | 55 |
| 7.8.2 | <i>Método VDP</i> | 57 |
| 7.9 | OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS..... | 58 |
| 7.9.1 | <i>Tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación (EE%)</i> | 58 |
| 7.9.2 | <i>Microscopía Electrónica de Barrido</i> | 60 |
| 7.9.3 | <i>Calorimetría Diferencial de Barrido</i> | 61 |
| 7.9.4 | <i>Difracción de Rayos X</i> | 62 |
| 7.9.5 | <i>Cinéticas de liberación</i> | 65 |
| 7.9.6 | <i>Capacidad Antioxidante</i> | 66 |
| 8 | CONCLUSIONES | 71 |
| 9 | BIBLIOGRAFÍA | 72 |
| 10 | APÉNDICE | 81 |

ÍNDICE DE CUADROS

| CUADRO | | PÁGINA |
|--------|--|--------|
| 1 | Materiales para la encapsulación en la industria alimentaria | 4 |
| 2 | Beneficios que ofrece el uso de los CD en sistemas alimentarios | 9 |
| 3 | Características del Eudragit | 17 |
| 4 | Constituyentes de <i>Lippia graveolens</i> | 24 |
| 5 | Cantidad de β - CD, timol y aceite esencial, para la elaboración de distintos complejos de inclusión | 32 |
| 6 | Potencial de oxidación del aceite esencial y sus complejos de inclusión a diferentes proporciones | 52 |
| 7 | Eficiencia de encapsulación de CI β -CD/timol y CI β -CD/AE | 54 |
| 8 | Tamaño promedio de nanopartículas placebo, cargadas con timol, con AE y con CI- β CD/AE | 59 |
| 9 | Potenciales de pico detectados en VDP para las NPs Eud/AE y NPs Eud/CI- β -CD/AE | 68 |
| 10 | Abreviaturas | 81 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA | | PÁGINA |
|--------|---|--------|
| 1 | Estructura química de las β -CD y dimensiones aproximadas de α -CD, β -CD y γ -CD | 5 |
| 2 | Estructura química del timol y Representación esquemática de β -CD/timol | 6 |
| 3 | Representación esquemática de la formación de un complejo de inclusión típico | 10 |
| 4 | Esquema del mecanismo de degradación/erosión | 13 |
| 5 | Esquema del mecanismo de liberación por hinchamiento | 14 |
| 6 | Representación esquemática de las nanoesferas y nanocápsulas | 15 |
| 7 | Estructura química del Eudragit L30 D55 | 16 |
| 8 | Estructura química de los monoterpenos mayoritario en <i>Lippia graveolens</i> | 23 |
| 9 | Estructura de los flavonoides detectados en <i>Lippia graveolens</i> | 25 |
| 10 | Estrategia experimental | 29 |
| 11 | Equipo para hidrodestilación | 30 |
| 12 | Equipo utilizado para la homogeneización y evaporación de solvente usando aceite esencial de orégano como activo a encapsular | 33 |
| 13 | Voltamperograma típico del aceite esencial libre e ilustración esquemática de la celda electroquímica | 37 |
| 14 | Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del aceite esencial de orégano. | 41 |
| 15 | Termogramas de Calorimetría Diferencial de Barrido de β -CD y complejos de inclusión β -CD/AE a diferentes proporciones 95:5, 90:10, 85:15 y 80:20. | 42 |
| 16 | Difractogramas de rayos X de timol, CI β -CD/timol 80:20, CI β -CD/timol 85:15, CI β -CD/timol 90:10, CI β -CD/timol 95:5 y β -CD. | 44 |
| 17 | Difractogramas de Rayos X para β -CD; CI β -CD/AE 95:5, CI β -CD/AE 90:10, CI β -CD/AE 85:15 y CI β -CD/AE 80:20 | 46 |
| 18 | Espectros de DRIF para timol, β -CD; mezcla timol y β -CD, CI β -CD/timol 80:20, CI β -CD/timol 85:15, CI β -CD/timol 90:10 y CI β -CD/timol 95:5 | 48 |
| 19 | Espectros de DRIF para AE, CI β -CD/AE 80:20, CI β -CD/AE 85:15, CI β -CD/AE 90:10, CI β -CD/AE 95:5 y β -CD | 50 |

| | | |
|----|--|----|
| 20 | Voltamperometría Diferencial de Pulso de complejos de inclusión β -CD/AE a diferentes concentraciones en solución amortiguadora Sörensen pH 5 | 52 |
| 21 | Cinéticas de liberación de AE desde CI con β -CD en solución amortiguadora Sörensen a pH 2, 4.5 y 7.2, durante 32 h | 55 |
| 22 | Cinéticas de capacidad antioxidante de complejos de inclusión β -CD/AE y CI β -CD/timol por el método ABTS | 57 |
| 23 | Voltamperograma Diferencial de Pulso de CI- β -CD/AE a pH 2, 4.5 y 7.2 | 58 |
| 24 | Micrografías (SEM) de NPs placebo de Eudragit L30 D55 a 5000X y cargadas con timol a 20000X, NPs de AE a 5000X y cargadas con CI- β -CD/AE a 5000X | 60 |
| 25 | Termogramas para Eud, mezcla física CI β -CD-Eud, nanopartículas de Eud, nanopartículas AE/Eud y nanopartículas CI β -CD/Eud | 62 |
| 26 | Difractogramas de Rayos X para Eud, mezcla física, CI β -CD/AE y Eud, nanopartículas de Eud, nanopartículas Eud/AE y nanopartículas Eud/CI β -CD/AE | 64 |
| 27 | Cinéticas de liberación de AE desde NPs con CI β -CD en solución amortiguadora Sörensen a pH 2, 4.5 y 7.2, durante 32 h..... | 65 |
| 28 | Cinética de capacidad antioxidante de aceite esencial libre, CI β -CD/AE, NPs Eud/AE y NPs Eud/CI β -CD/AE a pH 2, pH 4.5 y pH 7.2 por el método ABTS durante 90 min. | 67 |
| 29 | Voltamperograma Diferencial de Pulso de NPs eud/AE y NPs eud/CI- β -CD/AE a pH 2, 4.5 y 7.2..... | 70 |

1 INTRODUCCIÓN

Hoy en día, el padecimiento de enfermedades crónico degenerativas tales como las cardiovasculares, hipertensión, cáncer, entre otras, ha ido en aumento; por lo que se ha promovido el consumo de moléculas bioactivas (antioxidantes, vitaminas, ácidos grasos, etc.). Sin embargo, debido a su alta inestabilidad ante factores como la luz, la temperatura y el pH durante el procesamiento y almacenamiento, la volatilidad y baja solubilidad, así como las condiciones durante el paso de los alimentos por el tracto gastrointestinal; la industria alimentaria se ha enfocado hacia el desarrollo de nuevos sistemas de encapsulación, protección y liberación controlada (liposomas, nanopartículas, complejos de inclusión, nanofibras, etc.) con la finalidad de proporcionar estabilidad fisicoquímica con el medio exterior a compuestos bioactivos, inclusive mejorar su actividad biológica (Nedovic *et al.*, 2011; Del Valle, 2003; Schrooyen *et al.*, 2001).

La encapsulación es un proceso donde se atrapa una sustancia dentro de otra (material de pared); tiene como objetivo preservar la estabilidad de los compuestos bioactivos durante el procesamiento y almacenamiento, además de evitar interacciones entre el compuesto bioactivo con otros componentes del alimento (Nedovic *et al.*, 2011). Esta técnica se emplea para enmascarar sabores y aromas, y para controlar la reactividad de los compuestos a lo largo de la liberación de los antioxidantes naturales, ya que dichos agentes antioxidantes en la matriz del alimento podrían afectar las propiedades sensoriales de los productos. Además, las reacciones con lípidos, proteínas, carbohidratos, y otros aditivos podrían provocar una disminución de la actividad del compuesto (Del Toro-Sánchez *et al.*, 2010).

El aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) presenta compuestos tales como timol, carvacrol y p-cimeno que le proporcionan actividad antioxidante y antimicrobiana, sin embargo, su alta volatilidad limita su aplicación como conservador y como antioxidante.

La actividad antioxidante y antimicrobiana de los aceites esenciales está relacionada con la configuración química de sus componentes, las proporciones en que están presentes y las interacciones entre los mismos, afectando sus propiedades bioactivas. De tal forma que los aceites esenciales se pueden emplear como conservadores de alimentos, sin embargo se debe tomar en cuenta el impacto sobre la aceptabilidad del consumidor (Del Toro-Sánchez *et al.*, 2010).

El objetivo del presente trabajo fue la caracterización fisicoquímica de complejos de inclusión β - ciclodextrina/aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*) incorporados a nanopartículas poliméricas.

Los resultados obtenidos en esta investigación serán útiles para la utilización de nuevos sistemas de encapsulación controlada (doble encapsulación) para la protección de compuestos altamente sensibles como los aceites esenciales.

2 ANTECEDENTES

2.1 Sistemas de encapsulación y liberación controlada

La encapsulación es un proceso donde se atrapa una sustancia (agente activo) dentro de otra (material de pared); tiene como objetivo preservar la estabilidad de los compuestos bioactivos durante el procesamiento y almacenamiento, además de evitar interacciones entre el compuesto bioactivo con otros componentes del alimento. La encapsulación es una herramienta útil para mejorar la biodisponibilidad de moléculas bioactivas (antioxidantes, minerales, vitaminas, ácidos grasos, etc.) y células vivas (probióticos) en los alimentos (Nedovic *et al.*, 2011). Dentro de las tecnologías empleadas para encapsular ingredientes activos se encuentran los complejos de inclusión, liposomas, micro y nanopartículas (esferas o cápsulas), nanofibras, micelas, emulsiones (micro y nanoemulsiones), entre otros.

2.2 Materiales para la encapsulación

La mayoría de los materiales utilizados para la encapsulación en el sector alimentario son biomoléculas (Cuadro 1) (Wandrey *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Materiales para la encapsulación en la industria alimentaria

| Origen | Polímeros de carbohidratos | Proteínas | Lípidos |
|-------------------|---|--|--|
| Plantas | <ul style="list-style-type: none"> • Almidón: - Derivados • Celulosa - Derivados • Exudados de plantas - Goma arábica - Goma de mezquite | <ul style="list-style-type: none"> • Zeína • Aislado proteico de amaranto | <ul style="list-style-type: none"> • Ácidos grasos • Glicéridos • Ceras • Fosfolípidos |
| Marino | <ul style="list-style-type: none"> • Polisacáridos • Carrageninas • Alginato | | |
| Microbiano/animal | <ul style="list-style-type: none"> • Xantano • Gellan • Dextrano • Quitosano | <ul style="list-style-type: none"> • Caseínas • Proteínas de suero • Gelatina | <ul style="list-style-type: none"> • Ácidos grasos • Glicéridos • Ceras • Fosfolípidos (goma laca) |

2.2.1 Ciclodextrinas (CD)

Las ciclodextrinas más utilizadas son la α , β y γ , las cuales son oligosacáridos cíclicos que consisten de seis, siete y ocho unidades de glucopiranosas respectivamente, unidas por enlaces α -1-4. El interés por estos oligosacáridos surge debido a su estructura molecular, la parte externa tiene propiedades hidrofílicas, lo que permite alta solubilidad en agua mientras que la parte interna corresponde a una cavidad hidrofóbica, facilitando la formación de complejos de inclusión con compuestos hidrofóbicos (Mourtzinos *et al.*, 2008; Szejtli, 1998). En la Figura 1, se representa de manera esquemática a las ciclodextrinas y sus dimensiones aproximadas.

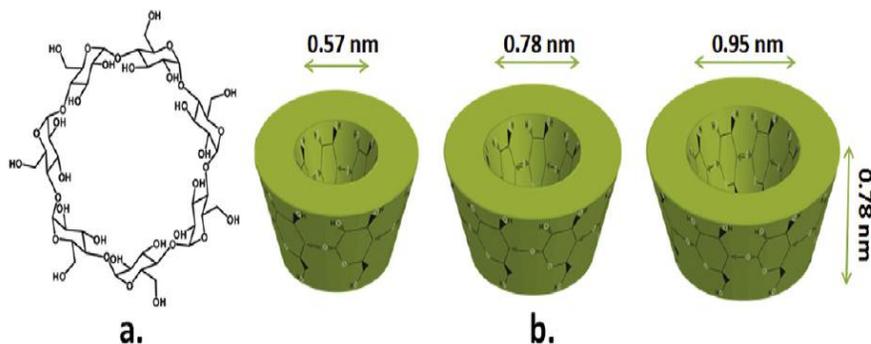


Figura 1. (a) Estructura química de las β -CD; (b) dimensiones aproximadas de α -CD, β -CD, y γ -CD
(Kayaci y Uyar, 2012)

2.2.2 Regulación de las ciclodextrinas

La situación reglamentaria de las CD en los alimentos difiere entre países. En los E.U, la α , β y γ -CD han sido reconocidas como GRAS (lista de la FDA de los aditivos alimentarios que son "generalmente reconocidos como seguros") y pueden ser comercializadas como tal. En Japón, la α , y γ -CD son reconocidos como productos naturales y su comercialización en el sector alimentario está restringida (Astray *et al.*, 2009). Por otra parte, el Comité de expertos de la FAO/OMS hace una recomendación sobre el contenido de los Aditivos en los alimentos (JECFA) sugiriendo un nivel máximo de 5 mg/kg por día de β -CD en los alimentos consumidos. Para α y γ -CD no está definida la ingesta diaria recomendada. Sin embargo, en julio de 2005 la Agencia de Protección Ambiental de E.U. (EPA) eliminó la necesidad de establecer un nivel máximo permisible de residuos de α , β y γ -CD en diversos productos alimenticios (Astray *et al.*, 2009).

2.3 Complejos de inclusión

Las dos principales causas de formación de los complejos de inclusión son las fuerzas de repulsión entre las moléculas de agua y la cavidad apolar de las CD, y la repulsión entre las moléculas de agua y la parte apolar del huésped (Szejtli, 1998). Lo importante del proceso de formación de los complejos, es la

liberación de moléculas de agua de alta entalpía de la cavidad; las cuales son desplazadas por las moléculas del huésped de naturaleza hidrofóbica para tener una asociación apolar-apolar (Mourtzinou *et al.*, 2008; Szejtli, 1998). Las propiedades espectrales de los huéspedes son modificadas, además, el máximo de los espectros UV se desplaza por varios nm y la fluorescencia se mejora fuertemente. En la mayoría de los casos la reactividad disminuye, es decir, las moléculas huésped se estabilizan. El huésped anteriormente hidrofóbico, sobre la formación de complejos, se convierte en hidrófilo (Szejtli, 1998). En la Figura 2 se muestra la estructura química del timol y la representación esquemática de complejo de inclusión β -CD/timol.

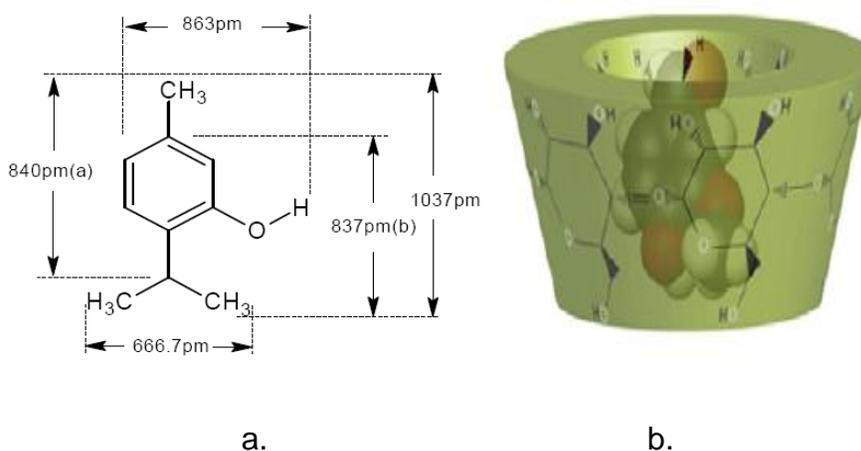


Figura 2. (a) Estructura química del timol y (b) Representación esquemática de β -CD/timol (Kayaci y Uyar, 2012; Chai *et al.*, 2011)

2.3.1 Técnicas para la formación de complejos

2.3.1.1. Co-precipitación

Este método es el más utilizado en el laboratorio. La ciclodextrina se disuelve en agua y el huésped se añade mientras se agita la solución. La concentración de β - ciclodextrina puede ser hasta del 20%. En muchos casos, la solución debe ser enfriada mientras se agita antes de que se forme el precipitado. El precipitado se colecta por decantación, centrifugación o filtración (Del Valle, 2003).

2.3.1.2. Formación de complejos por pasta

En este método sólo una pequeña cantidad de agua se añade para formar una pasta, mezclándose con la ciclodextrina utilizando un mortero, o una amasadora cuando es a grande escala. La cantidad de tiempo requerido depende del huésped empleado. El complejo resultante se puede secar directamente o hacer un lavado con agua y recoger por filtración o centrifugación. Generalmente, la pasta se seca y se muele para obtener un el complejo en forma de polvo (Del Valle, 2003).

2.3.1.3. Mezcla húmeda y calefacción

Este método emplea poca o nada de agua. La cantidad de agua puede variar de 20-25% o también se puede hacer en seco. El huésped se mezcla perfectamente con las β - ciclodextrinas y se colocan en un recipiente herméticamente cerrado para calentar a 100 °C y finalmente secar los complejos de inclusión (Del Valle, 2003).

2.3.1.4. Extrusión

La extrusión combina el mezclado y el calentamiento, las ciclodextrinas, huésped y el agua se mezclan previamente, donde las condiciones de procesamiento pueden ser controladas. La ventaja de este método es que es un proceso continuo y que utiliza muy poca agua. Sin embargo, uno de los problemas que se presenta es el calor que se genera debido a que puede afectar al huésped que se va a complejar (Del Valle, 2003).

2.3.1.5. Mezcla en seco

Algunos huéspedes pueden formar complejos con sólo mezclarlos con las CD. Este método generalmente se emplea con aceites o huéspedes líquidos a temperatura ambiente. La ventaja es que no se requiere agregar agua, sin embargo el riesgo es la formación de conglomerados teniendo como resultado la formación de complejos incompleta (Del Valle, 2003).

2.3.2 Aplicaciones de los complejos de inclusión

Los complejos de inclusión de ciclodextrinas son ampliamente utilizados en la industria de los alimentos con el fin de prolongar la vida útil y proporcionar un alto grado de estabilidad a compuestos volátiles o inestables, protegiéndolos de factores ambientales y de procesamiento como la temperatura, la luz y el calor; además de enmascarar sabores (Del Valle, 2003; Schrooyen *et al.*, 2001). La mayoría de los sabores naturales y artificiales son aceites o líquidos volátiles, y la complejación con ciclodextrinas ofrece una alternativa prometedora para su protección. De igual forma, los aromas y antioxidantes son en su mayoría sensibles a dichos factores, sin embargo, los complejos de inclusión de ciclodextrinas es una manera eficaz para la estabilización, protección y para controlar la liberación de estos aditivos funcionales (Koontz *et al.*, 2009; Szenté y Szejtli, 2004; Hashimoto, 2002). También han sido utilizados para incrementar la solubilidad en agua de diversos compuestos, como las vitaminas y colorantes alimentarios (Polyakov *et al.*, 2004; Miyazawa *et al.*, 1995).

Las ventajas que tiene la formación de complejos de inclusión dentro de la industria alimentaria, se debe a que cada molécula huésped está rodeada de forma individual por una ciclodextrina, y esto conduce a una serie de cambios en las propiedades químicas y físicas de las moléculas huésped, como la modificación de la reactividad química de las moléculas dentro de la cavidad, modificación de sustancias líquidas a polvos, protección contra la degradación de las sustancias por microorganismos. Estas características de las ciclodextrinas o sus derivados hacen adecuados los sistemas para aplicaciones en química analítica, la agricultura, el sector farmacéutico y alimentario (Del Valle, 2003). En el Cuadro 2, se muestran algunas aplicaciones en diversos sistemas alimentarios.

Cuadro 2. Beneficios que ofrece el uso de los CD en sistemas alimentarios

| Beneficios | Sistema alimentario |
|--|---|
| Protección contra el deterioro de sustancias sensibles | Grasas, terpenos, sabores, aromas |
| Eliminación o reducción de sabores indeseables | Disminuye el fuerte sabor de la toronja, y el olor de algunas vitaminas |
| Eliminación selectiva de colesterol | Queso y productos de mantequilla |
| Mejora la solubilidad de los ingredientes lipofílicos | Carotenos, curcumina, etc. |
| Mejora la estabilidad de una emulsión | Mayonesa y productos lácteos |

(Moreira, 2014¹)

2.4 Técnicas de caracterización

La evaluación de la formación de los complejos de inclusión y su caracterización completa no es una tarea sencilla, requiere a menudo el uso de diferentes métodos de análisis, cuyos resultados tienen que ser combinados y examinados conjuntamente, ya que cada método explora una característica particular del complejo de inclusión. El uso concomitante de diferentes técnicas puede permitir un análisis más profundo de las interacciones presentes en los complejos (Mura, 2014).

Los diferentes métodos disponibles se basan generalmente en la detección de alguna variación de una propiedad química o física del huésped como consecuencia de la asociación y debe ser suficiente como para ser detectada con precisión. En la Figura 3 se muestra la representación esquemática de la formación de un complejo de inclusión típico (Mura, 2014).

¹ Moreira Da Silva A. M. G. Instituto Politécnico de Caimbra.

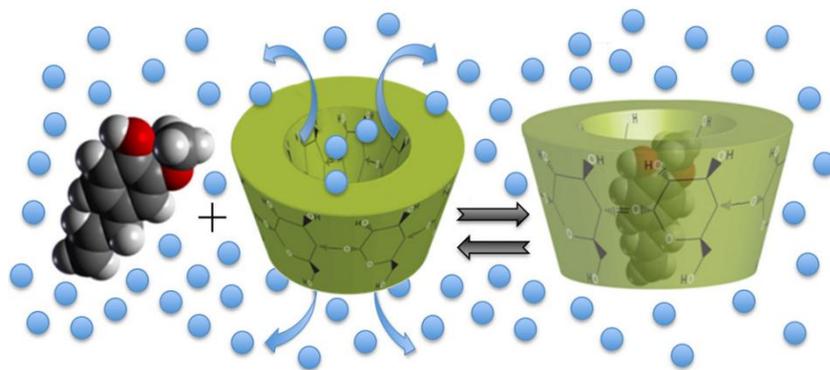


Figura 3. Representación esquemática de la formación de un complejo de inclusión típico.

La formación de complejos de inclusión puede detectarse por métodos muy diversos, gracias a las modificaciones que se producen en las propiedades de la molécula complejada. Estas modificaciones pueden ser físicas (solubilidad, tensión superficial); químicas (reactividad, variaciones en el valor de las constantes de ionización ácido-base) o espectroscópicas, tanto modificaciones cualitativas (posición de los máximos de absorción) como cuantitativas (variaciones en el coeficiente de absorción molar o en la intensidad de fluorescencia) de los parámetros espectrales (Martínez *et al.*, 1985).

La formación de los complejos depende en gran medida de las dimensiones de las ciclodextrinas y del huésped, además de la disposición particular de los grupos funcionales de las moléculas. Los complejos de inclusión formados entre huéspedes y moléculas de ciclodextrina pueden ser caracterizados tanto en estado sólido como en solución.

Para estado sólido, las técnicas de caracterización más utilizadas son: métodos termo-analíticos, microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos X, espectroscopía de infrarrojo, cromatografía de capa fina, calorimetría diferencial de barrido, entre otras. Para la caracterización de complejos de inclusión en solución se tienen técnicas como electroquímica, conductividad, estudios de

solubilidad, métodos de espectroscopía, resonancia magnética nuclear, espectroscopía ultravioleta/visible, espectroscopía de fluorescencia, entre otras (Singh *et al.*, 2010).

2.4.1 Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido, es utilizada para estudiar los aspectos microscópicos de la materia prima (la ciclodextrina y el huésped) y el producto obtenido por co-precipitación/evaporación. La diferencia en el estado de cristalización de la materia prima y el producto visto en el microscopio electrónico, indica la formación de los complejos de inclusión, es una clara diferencia en el estado de cristalización de la materia prima y el producto obtenido por co-precipitación (Singh *et al.*, 2010).

2.4.2 Difracción de Rayos X

La difracción de las ondas electromagnéticas se produce porque los elementos de una rejilla, absorben la radiación y actúan a su vez como fuentes secundarias remitiendo la radiación en todas direcciones. Cuando se hace incidir un haz de rayos X sobre un cristal, éste choca con los átomos haciendo que los electrones que se encuentren en su trayectoria vibren con una frecuencia idéntica a la de la radiación incidente. Estos electrones actúan como fuentes secundarias de nuevos frentes de onda de rayos X con la misma longitud de onda y frecuencia. Cuando un cristal difracta rayos X, las ondas dispersadas electromagnéticamente remitidas interfieren entre sí constructivamente, sólo en algunas direcciones estando con ángulo Θ (Cortés *et al.*, 2006).

2.4.3 Espectroscopía de Infra-Rojo

La espectroscopía infrarroja se utiliza para estimar la interacción entre la ciclodextrina y las moléculas huésped en estado sólido. Las bandas que podrían ser asignadas a las moléculas huésped son fácilmente traslapadas por las bandas del espectro de ciclodextrina. Esta técnica no es adecuada para detectar complejos de inclusión y es menos aclaratoria que otros métodos. La aplicación de

la espectroscopía de infrarrojo se limita cuando se tienen algunas bandas características (Singh *et al.*, 2010).

2.4.4 Electroquímica

(a) Polarografía. Es una técnica electroquímica para identificar y estimar la concentración de una sustancia de interés en una celda electroquímica por medio de la doble medición de la corriente que fluye a través de la celda y el potencial electrónico. Es un método adecuado para estudiar formación de complejos de inclusión.

(b) Conductividad. La medición de la conductividad puede ser utilizada para caracterizar la formación de complejos de inclusión.

2.4.5 Calorimetría

Los cambios en las propiedades termodinámicas debido a formación de complejos de inclusión, se puede medir por microcalorimetría. Estos cambios en la entalpía y la entropía se asocian con el cambio en el comportamiento de la estructura del agua dentro de la cavidad, la eliminación o la reestructuración del agua alrededor de la molécula huésped (Singh *et al.*, 2010).

2.4.6 Perfil de liberación

El mecanismo y cinética de liberación de una sustancia desde nanopartículas poliméricas depende de la naturaleza del polímero, del agente encapsulante y del medio en disolución. El pH del medio en el que se realiza la liberación, tiene una influencia en la velocidad con que se lleva a cabo la liberación. Tomando en cuenta estos factores se pueden diseñar sistemas de encapsulación y liberación que actúen lentamente y de manera continua durante largos periodos (Sáez *et al.*, 2004).

Los mecanismos más importantes que regulan la liberación de un compuesto activo son: difusión, hinchamiento, biodegradación/erosión y presión osmótica. Para que se lleve a cabo cada uno de ellos dependerá de la

composición de la matriz polimérica y del medio circundante, por lo que la liberación se puede llevar a cabo por uno o varios mecanismos (Barba *et al.* 2009), los cuales se muestran a continuación:

a) Liberación por difusión. La migración del compuesto activo al medio de liberación puede darse a través de la estructura molecular del polímero o bien a través de macro o microporos existentes en la matriz polimérica (Siepmann *et al.*, 2012).

b) Liberación por degradación o erosión. La degradación es el proceso mediante el cual las cadenas del polímero sufren ruptura o hidrólisis de sus enlaces, generándose cadenas más cortas sin pérdida de materia. Y la erosión se refiere a la disminución de masa de la matriz, la cual puede deberse a la pérdida de monómeros, oligómeros y otros productos solubles en el medio circundante (Figura 4) (Lao *et al.*, 2011). Este mecanismo tiene importancia cuando el activo se encuentra disperso dentro del polímero, de tal forma que se va liberando a medida que éste se degrada (He *et al.*, 2005).

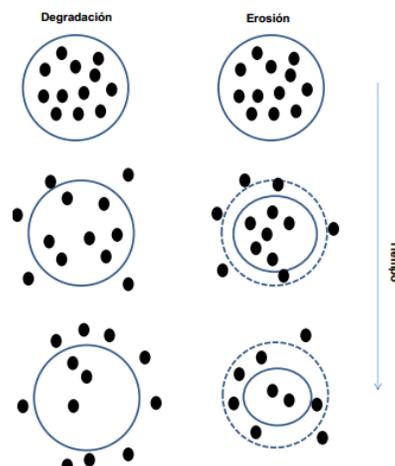


Figura 4. Esquema del mecanismo de degradación/erosión

(López, 2012)

b) Liberación por hinchamiento. El polímero se hincha debido a la adsorción del medio y el compuesto activo puede difundir a través de la zona de la matriz que ha sufrido hinchamiento (Figura 5) (Peppas *et al.*, 1993).

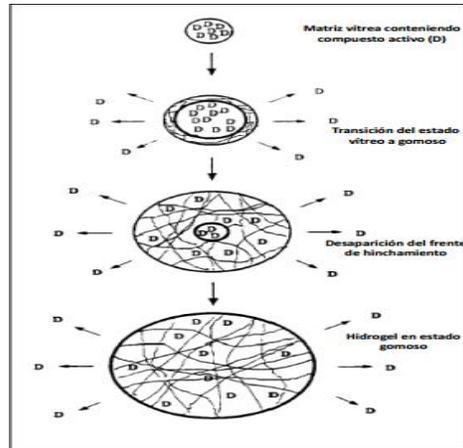


Figura 5. Esquema del mecanismo de liberación por hinchamiento (López, 2012)

2.5 Doble encapsulación

Recientemente, se ha puesto atención en la doble encapsulación debido a que se logra una liberación más controlada del activo y una mejor estabilidad. Dentro de estas tecnologías se encuentra la elaboración de nanopartículas.

2.6 Nanopartículas poliméricas (NP's)

Las nanopartículas se definen como sistemas coloidales submicrónicos con diámetros que oscilan entre 1 y 1000 nm y de acuerdo al proceso utilizado para su elaboración se pueden obtener nanoesferas o nanocápsulas (Figura 6). Las nanoesferas están formadas por una densa matriz polimérica en la que se dispersa el activo en la superficie de la partícula y tienen un diámetro entre 100 y 200 nm, mientras que las nanocápsulas son sistemas vesiculares donde el activo se encuentra en una cavidad acuosa u oleosa, rodeado por una membrana polimérica, por tanto, se pueden considerar como un sistema de “depósito” (Letchford *et al.*, 2007; Yih y Al-Fandi, 2006; Brigger *et al.*, 2002; Couvreur *et al.*, 2002).

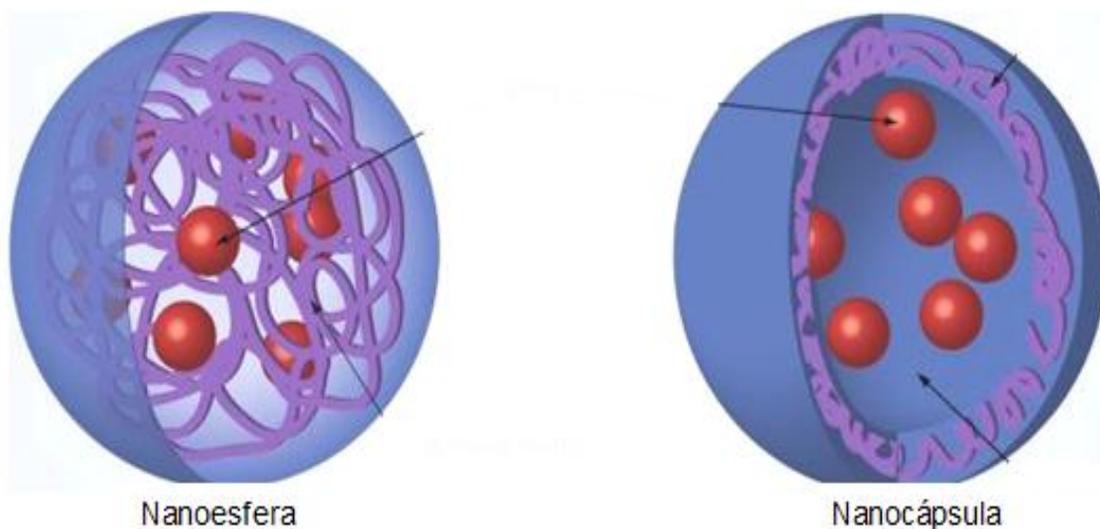


Figura 6. Representación esquemática de las nanoesferas y nanocápsulas
(Bei *et al.*, 2010)

Existen diversos agentes encapsulantes para la elaboración de nanopartículas, dentro de los naturales se usan almidones, ciclodextrinas, gomas, lípidos, proteínas etc. Sin embargo, se prefieren los agentes encapsulantes sintéticos los cuales propician una mayor estabilidad al sistema, dentro de éstos se encuentran los Eudragit.

2.6.1 Eudragit

Los Eudragit, son copolímeros del ácido metacrílico y diferentes ésteres acrílicos o metacrílicos de interés farmacéutico, son particularmente atractivos por su elevada estabilidad química, su compatibilidad con diferentes materiales y por el número de variedades disponibles, que cumplen con un amplio espectro de características de solubilidad y permeabilidad. Los Eudragit tienen distintas propiedades (Cuadro 3) y farmacológicamente son inertes (Lira, 2009).

El Eudragit L30 D-55 (Figura 7), proporciona propiedades gastrorresistentes a las nanopartículas (Pastor *et al.*, 2013). Como grupo funcional tiene ácido metacrílico.

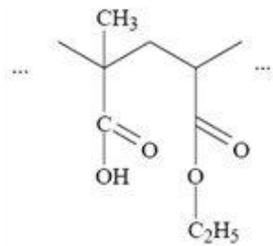


Figura 7. Estructura química del Eudragit L30 D55

(Pastor *et al.*, 2013)

2.6.1.1 Aplicaciones de los Eudragit

Los Eudragit, son polímeros sensibles al pH, por lo cual son utilizados ampliamente en el suministro de fármacos (Zhang *et al.*, 2012), y para la elaboración de sistemas de encapsulación y liberación controlada (Hao, *et. al.*, 2013).

Una de las aplicaciones más destacadas es su empleo como materiales de recubrimiento. Los Eudragit E, generan películas solubles en pH ácidos debido a los grupos funcionales amino de la cadena lateral, esta característica es de utilidad para para la liberación de fármacos a nivel gástrico, enmascarando propiedades sensoriales de algunos fármacos. Las formas aniónicas de Eudragit (FS, L y S), tienen en su estructura grupos carboxílicos y son solubles a valores más elevados de pH, por lo que su aplicación es como materiales gastroresistentes. Las variedades insolubles (NE, NM, RL, RS), dan lugar a películas adecuadas para la liberación controlada de fármacos, con cubiertas de permeabilidad proporcional a su espesor (Barreto, 2009).

Cuadro 3. Características del Eudragit

| Tipos | Variedades | Presentación | Solubilidad/ Permeabilidad | Aplicaciones |
|--------------|--|--|---|--|
| Aniónicos | L100-55 | Polvo | Soluble pH > 5.5 | Liberación en duodeno |
| | L30D-55 | Dispersión acuosa 30% | | |
| | L12.5 | Disolución en alcohol isopropílico | Soluble pH > 6.0 | Liberación en yeyuno |
| | L100 | Polvo | Soluble pH > 7.0 | Liberación en íleon y colon Liberación en colon |
| | S100 | Polvo | | |
| | FS30D | Dispersión acuosa 30% | | |
| | E100 | Gránulos | Soluble en Fluido gástrico hasta pH=5.0 | Enmascaramiento organoléptico |
| E12.5 | Disolución en alcohol isopropílico/acetona 12.5% | | | |
| Catiónicos | EPO | Polvo | | Cubierta aislamiento |
| | RL12.5 | Disolución en alcohol isopropílico/acetona 12.5% | Insoluble, alta permeabilidad | Formulaciones de liberación controlada |
| | RL100 | Gránulos | | |
| | RLPO | Polvo | Insoluble, baja permeabilidad | Adecuado para estructuras matriciales |
| | RL30D | Dispersión acuosa 30% | | |
| | RS12.5 | Disolución en alcohol isopropílico/acetona 12.5% | | |
| | RS100 | Gránulos | Insoluble y permeable | Formulaciones de liberación controlada |
| RSPO | Polvo | | | |
| RS30D | Dispersión acuosa 30% | | | |
| Neutros | NE30D | Dispersión acuosa 30% con 1.5% emulsificante | Insoluble y permeable | Formulaciones de liberación controlada |
| | NE40D | Dispersión acuosa 40% con 2% emulsificante | | |
| | NM30D | Dispersión acuosa 30% con 0.7% emulsificante | | Adecuado para estructuras matriciales |

(Lira, 2009)

2.7 Capacidad antioxidante

Un antioxidante se define como "cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con su sustrato oxidable, es capaz de retrasar o inhibir significativamente la oxidación de ese sustrato", pero también se define como "cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula" (Carocho y Ferreira, 2013).

Los antioxidantes, incluyendo compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos y taninos), tienen diversos efectos biológicos, tales como anti-inflamatorios, anti cancerígenos y antiateroscleróticos, debido a su actividad antioxidante (Krishnaiah *et al.*, 2011). La actividad antioxidante puede ser eficaz a través de diversas maneras: como inhibidores de las reacciones de oxidación de radicales libres (oxidantes preventivas) mediante la inhibición de la formación de radicales libres de lípidos; mediante la interrupción de la propagación de la reacción en cadena de la auto-oxidación (antioxidantes cadena de rotura); como extintores de oxígeno singlete, a través de la sinergia con otros antioxidantes; como agentes que convierten la reducción de hidroperóxidos en compuestos estables; como quelantes de metales que convierten el metal de pro-oxidantes (hierro y derivados de cobre) en productos estables; y finalmente, como inhibidores de enzimas pro-oxidantes (lipooxigenases) (Carocho y Ferreira, 2013).

Existen cinco tipos de antioxidantes principales; los primarios, secuestradores de oxígeno, secundarios, enzimáticos y agentes quelantes.

Dentro de los antioxidantes primarios se encuentran los compuestos fenólicos, los cuales están presentes en muchas hierbas y plantas y son considerados metabolitos secundarios cuya base es un fenol, un grupo hidroxilo sobre un anillo aromático, y de éste se forman moléculas como antocianinas, cumarinas, fenilpropanoides, flavonoides, taninos y lignanos. Estos antioxidante primarios, acaban con las cadenas de radicales libres en la oxidación de lípidos y funcionan donando electrones como los tocoferoles. Los secuestradores de oxígeno, reaccionan con el oxígeno removiéndolo, entre éstos se encuentra el

ácido ascórbico y palmitato de ascorbilo. Los antioxidantes secundarios, funcionan descomponiendo los hidroperóxidos lipídicos en productos finales estables. Los antioxidantes enzimáticos, son enzimas cuya función es la remoción de oxígeno disuelto (glucosa oxidasa), o removiendo especies altamente oxidativas (superóxido dismutasa). Los agentes quelantes, mejoran la acción de los antioxidantes fenólicos (ácido cítrico, aminoácidos y fosfolípidos (González, 2009).

Los compuestos fenólicos presentan propiedades antioxidantes favorables. Se encuentran en diferentes partes de la planta como las hojas, raíces y partes aéreas. Están presentes en plantas aromáticas (especias), por esta razón el uso de algunas especias no es sólo para mejorar el sabor en los alimentos, sino para incrementar la vida de anaquel de los mismos debido a su actividad antioxidante y antimicrobiana (González, 2009).

Hay al menos cuatro tipos de sistemas generales de antioxidantes: (1) enzimas (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, y catalasa); (2) moléculas grandes (albúmina, ceruloplasmina, ferritina), (3) moléculas pequeñas (ácido ascórbico, glutatión, tocoferol, carotenoides, poli fenoles), y (4) algunas hormonas (estrógeno, la angiotensina, la melatonina). Por otro lado, hay múltiples fuentes de radicales libres y oxidantes ($O\bullet-$, O_2 , $HO\bullet$, $ONOO-$, $HOCl$, $RO(O)\bullet$, $LO(O)\bullet$), y ambos, oxidantes y antioxidantes tienen diferentes características físicas y químicas. Los antioxidantes, actúan por mecanismos múltiples en un solo sistema o por un mecanismo único diferente dependiendo del sistema de reacción. Además, los antioxidantes pueden responder de manera distinta a diferentes fuentes de radicales (Prior, 2005).

2.7.1 Técnicas para la determinación de capacidad antioxidante

Existen diversos métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* en los alimentos, los cuales se basan en el mecanismo de reacción. Entre otros se encuentran; método de la capacidad de absorber radicales de oxígeno (ORAC), el método de Folin-Ciocalteu, 1,1- difenil-2-picrilhidrazil ($DPPH\bullet$), poder

antioxidante reductor de hierro (FRAP), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ABTS (Prior, 2005) y técnicas electroquímicas.

2.7.1.1 Método ORAC (*Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno*)

El ensayo ORAC utiliza beta-ficoeritrina como un sustrato oxidable de proteína y 2,2'-azobis (2-amidinopropano) diclorhidrato (AAPH) como un generador de radicales peróxido $Cu_{2+}-H_2O_2$ o como generador de radicales hidroxilo (Krishnaiah *et al.*, 2011).

Un antioxidante puede inhibir las oxidaciones generadas por el radical peróxido. La técnica ORAC, es una técnica que mide la inhibición de dichas oxidaciones y por lo tanto refleja la ruptura de la cadena de radicales por transferencia de átomos de hidrógeno. El radical peróxido reacciona con una sonda fluorescente para formar un producto no fluorescente, el cual puede cuantificarse fácilmente por espectroscopía de fluorescencia. La capacidad antioxidante se determina por una disminución en la velocidad y cantidad de producto formado conforme avanza el tiempo (Prior, 2005).

2.7.1.2 Método Folin-Ciocalteu

El ensayo de Folin-Ciocalteu se utiliza para determinar el contenido de fenoles totales (Krishnaiah *et al.*, 2011). Se basa en una reacción de óxido/reducción, es un método simple, sensible y preciso. Sin embargo, a pH bajo la reacción es lenta (Prior, 2005).

2.7.1.3 Método 1,1- difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•)

Se basa en la medición de la capacidad de los antioxidantes para reducir al DPPH•, y se evalúa por la pérdida de color de éste a 515 nm. El DPPH tiene un color púrpura intenso (Prior, 2005).

2.7.1.4 Método FRAP

Mide la capacidad del sustrato para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} , donde el Fe^{2+} forma un complejo colorido con la 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). La reacción detecta compuestos con potenciales redox <0.7 V (el potencial redox de Fe^{3+} -TPTZ), por lo que este método indica la capacidad de mantener el estado redox en las células o tejidos. El potencial de reducción está relacionado con el grado de hidroxilación y de conjugación en polifenoles (Prior, 2005).

2.7.1.5 Método de ABTS

Este método se basa en la capacidad de los antioxidantes para atrapar el radical catión de larga vida $\text{ABTS}^{\bullet+}$. El ABTS es oxidado por el radical peróxido u otros reactivos oxidantes a su radical catión $\text{ABTS}^{\bullet+}$, el cual presenta un color azul intenso. La capacidad del antioxidante se determina como la capacidad de los compuestos de prueba para estabilizar al $\text{ABTS}^{\bullet+}$, lo cual se ve reflejado en la decoloración de la mezcla de reactivos (Prior, 2005).

2.7.1.6 Técnicas electroquímicas

La electroquímica ha sido definida clásicamente como la ciencia que trata los cambios químicos producidos por la corriente eléctrica, y de la producción de electricidad mediante la energía de reacciones químicas. Teóricamente, las dos ramas son de igual importancia. Sin embargo, industrialmente, los cambios químicos y físicos producidos por el uso de la corriente eléctrica son, los más importantes (Mantell, 1980).

Hoy en día, las técnicas electroquímicas, son muy usadas debido a su simplicidad, bajo costo, rapidez y porque son capaces de realizar mediciones continuas (Zhao *et al.*, 2013).

Existe una relación entre el potencial de oxidación y el poder antioxidante de los compuestos, donde un "bajo potencial de oxidación" corresponde a un "alto poder antioxidante". Cuanto menor es el potencial de oxidación de los extractos,

mayor será la capacidad antioxidante. Un bajo potencial oxidativo, indica mayor capacidad de donar electrones al sistema de generación de radicales libres (Dar, 2013).

2.8 Orégano mexicano (*Lippia graveolens*)

La planta del orégano es un arbusto distribuido ampliamente en la República Mexicana, en zonas tropicales, templadas, áridas y semiáridas. Se tienen identificadas alrededor de 40 especies de plantas a las cuales se les denomina “orégano”, pertenecientes a cuatro familias botánicas: Asterácea (Compositae), Lamiaceae (Labiatae), Fabaceae (Leguminoseae) y Verbenaceae (Flores, 2009). En la familia Verbenaceae se ubica el género *Lippia*, del cual se desarrollan tres especies de orégano: *Lippia graveolens* HBK., *L. berlandieri* Schauer y *L. palmeri*. Se menciona que *Lippia graveolens* y *Lippia berlandier* son sinónimos de la misma especie. Dichas especies presentan características químicas semejantes a las del orégano europeo (*Origanum spp*), por lo que su uso también es similar (Flores, 2009). En México, se desarrollan dos especies de *Lippia* con características semejantes a las del orégano europeo (*Origanun spp.*), consideradas sustitutos de éste: *L. palmeri* en Baja California, Sonora y parte de Sinaloa, y *L. graveolens* de mayor distribución en el resto de la República Mexicana (González, 2007). La distribución de *Lippia graveolens* es principalmente en los estados de Chihuahua, Durango, Tamaulipas y Coahuila, le siguen, en orden de importancia, Jalisco, Zacatecas, Querétaro, Hidalgo y Baja California (Flores, 2009).

El orégano tiene dos usos principales: como condimento y como materia prima para la producción de aceites esenciales, utilizados como aditivo en la industria alimentaria por sus propiedades antioxidantes, donde el timol y carvacrol son compuestos que inhiben los radicales libres, retrasando la oxidación de lípidos (Ávila, 2011); actualmente también se emplea como antimicrobiano para combatir algunas bacterias patógenas (Chai *et al.*, 2011; Aydin *et al.*, 2005; Baydar *et al.*, 2004; Nakatani, 2000), tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas,

también contra levaduras y hongos filamentosos (González, 2009); por tanto, se utiliza con frecuencia como un antibiótico, con un amplio espectro antibacteriano y fungicida (Pitchford, 2007; Sánchez, *et al.*, 2007). La propiedad antibacteriana y antioxidante se puede relacionar con la presencia de los monoterpenos timol, carvacrol y p-cimeno (Figura 8), los cuales son compuestos mayoritarios del aceite esencial de orégano; esto explica su uso en la medicina tradicional para solucionar problemas de enfermedades infecciosas (Silva y Dunford, 2005).

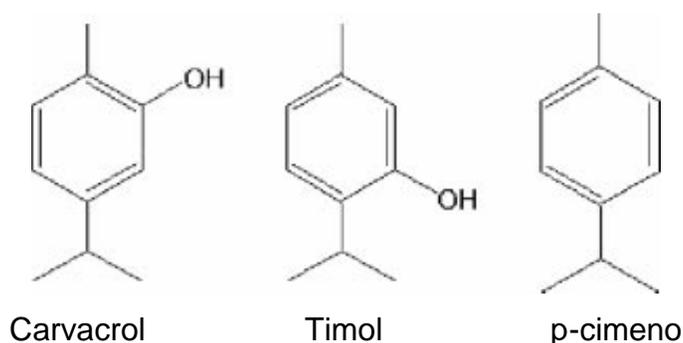


Figura 8. Estructura química de los monoterpenos mayoritario en *Lippia graveolens* (Burt *et al.*, 2007).

La composición química del aceite esencial de orégano consiste en hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres), sustancias azufradas y nitrogenadas (González, 2009). En el Cuadro 4, se enlistan algunos de los constituyentes del aceite esencial de *Lippia graveolens*; también se han identificado más de veinte flavonoides. En la Figura 9, se muestran algunos flavonoides detectados (Lin *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Constituyentes de *Lippia graveolens*

| Componentes | Porcentaje en muestra | Componentes | Porcentaje en muestra |
|--|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| Timol | 7.4 | α Tujeno | 0.6 |
| Carvacrol | 44.8 | α Pineno | 0.4 |
| Eugenol | 0.1 | Camfeno | 0.1 |
| Metil eugenol | 3.4 | Oct-1-en-e-ol | 0.2 |
| α -Copaeno | 0.1 | Sabine | - |
| β -Bourbuneno | - | β -pineno | - |
| γ -Muuroleno | 0.1 | β -Myrceno | 2.1 |
| Germacreno D | - | α -felandreno | - |
| β -Selineno | 0.2 | Δ -3-Careno | 0.2 |
| α -Muuroleno | - | α -Terpineno | 1.7 |
| γ -Cadineno | 0.4 | ρ -cimeno | 21.8 |
| Cis-Calameleno | 0.1 | 1.8-Cineol | 1.0 |
| δ -Cadineno | 0.2 | Limoneno | T |
| Elemol | - | Z- β -Ocimeno | 0.1 |
| E-Nerolidol | - | E- β -Ocimeno | - |
| Espatuleno | 0.2 | γ -Terpineno | 4.4 |
| Sesquiterpenos conteniendo Oxígeno | 1.8 | Cis-p-menth-2-en- 1-ol | - |
| Guaiol | 0.2 | Terpineno-4-ol | 1.1 |
| Cis-piperitol | - | Borneol | 0.1 |

(Salgueiro *et al.*, 2003).

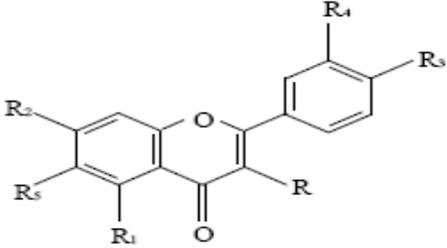
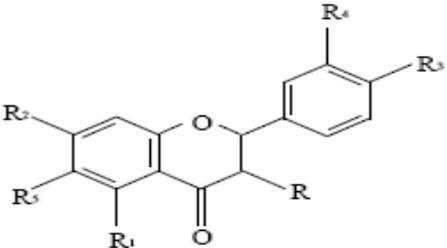
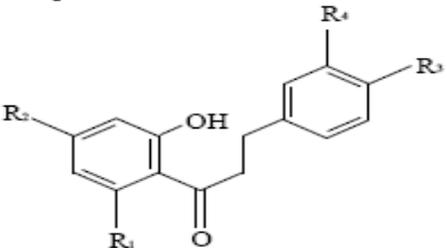
| | |
|---|--|
| <p>Grupo I: Flavonas (R=H) y Flavonoles (R=OH o O-gli)</p>  | <p>Galangina (I-1): R=R1=R3=OH, R2=R4=R5=H Apigenina 7-O-glucosido (I-2-A), Escutelareina (I-3): R1=R2=R3=R5=OH, R=R4=H Luteolina (I-6): R1=R2=R3=R4=OH, R=R5=H Luteolina 7-O-glucoside (I-6-A) Quercetina (I-7): R=R1=R3=R2=R4=OH, R5=H</p> |
| <p>Grupo II: Flavanonas</p>  | <p>Pinocembrina (II-1): R1=R2=OH, R=R3=R4=R5=H Naringenina (II-2): R1=R2=R3=OH, R=R4=R5=H Sakuranetina (II-3): R1=R3=OH, R2=OMe, R=R4=R5=H Eriodictiol (II-4): R1=R2=R3=R4=OH, R=R5=H Taxifolina (II-5): R=R1=R2=R3=R4=OH, R5=H</p> |
| <p>Grupo III: Dihidrochalconas</p>  | <p>Floridzina (Floretina-6-O-glucosido) (III-1-A)</p> |

Figura 9. Estructura de los flavonoides detectados en *Lippia graveolens*

3 HIPÓTESIS

La nanoencapsulación polimérica de complejos de inclusión β -CD/aceite esencial de orégano, permite un mejor control de la liberación y conserva la capacidad antioxidante del mismo.

4 JUSTIFICACIÓN

La encapsulación, es una técnica que se aplica para preservar y proteger numerosos compuestos. Es una forma de empacar materiales sólidos, líquidos o gaseosos.

La doble encapsulación permite conservar eficientemente las propiedades fisicoquímicas y biológicas de sustancias químicas muy sensibles o altamente volátiles como es el caso de aceites esenciales. Además evita la formación de aromas indeseables producidos por interacciones entre componentes de los alimentos, otorga protección frente a la oxidación inducida como consecuencia de la radiación UV, minimiza la interacción entre componentes aromáticos, aumenta la vida útil de los aromas y controla la liberación de los mismos dentro de un producto. La doble encapsulación es una excelente alternativa para proteger compuestos nutracéuticos. Por ello, en este trabajo se busca preservar dichas propiedades del orégano y estudiar la liberación con la finalidad de ampliar sus aplicaciones en la industria alimentaria.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

Caracterizar fisicoquímicamente los complejos de inclusión β -ciclodextrina/aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*) incorporados a nanopartículas poliméricas.

5.2 Objetivos Particulares:

- 1) Formar complejos de inclusión β -ciclodextrina/aceite esencial de orégano.
- 2) Caracterizar fisicoquímicamente el complejo de inclusión.
- 3) Incorporar los complejos de inclusión β -ciclodextrina/aceite esencial a nanopartículas de Eudragit L30-D55.
- 4) Caracterizar fisicoquímicamente la doble encapsulación.

6 METODOLOGÍA

6.1 Materiales

Para el desarrollo de esta investigación se utilizó orégano mexicano (*Lippia graveolens*) recolectado en la etapa de floración en la comunidad de San Juan Raya, Puebla. El estándar utilizado fue timol al 99.5%, y β -CD al 97% como material de pared. Para las pruebas electroquímicas se empleó Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , todos los reactivos fueron suministrados por Sigma Aldrich; los solventes fueron de grado analítico. Para la elaboración de nanopartículas poliméricas se empleó Eudragit L30 D55 donado por Helm de México (México) y alcohol polivinílico (PVA).

6.2 Métodos

Se elaboraron complejos de inclusión y nanopartículas con aceite esencial de orégano y con timol, con la finalidad de hacer un comparativo de las propiedades fisicoquímicas de dichos sistemas de encapsulación y liberación controlada, tomando el timol como estándar, ya que es uno de los componentes del aceite esencial de orégano. La estrategia experimental planteada fue por una parte, la elaboración de complejos con AE y su incorporación a NPs poliméricas, y por otra, la elaboración de complejos con timol y su incorporación a NPs, realizando la caracterización fisicoquímica en cada etapa (Figura 10).

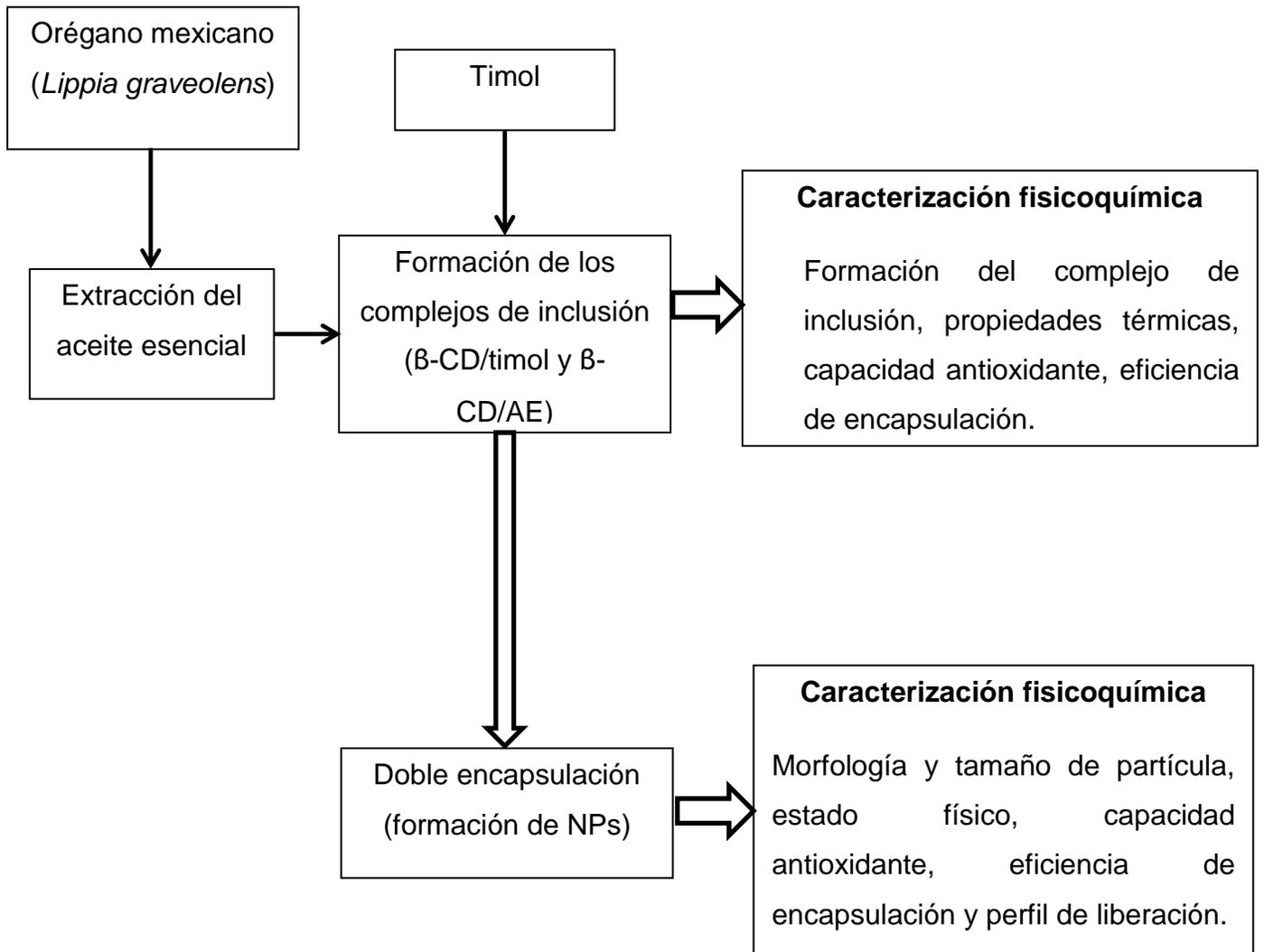


Figura 10. Estrategia experimental

6.2.1 Extracción de aceite esencial por hidrodestilación

Una muestra seca de 30 g se colocó en agua y se sometió al proceso de hidrodestilación para la extracción de aceite en un equipo tipo Clevenger durante 3 h (Figura 11). El agua es usada para calentar y generar vapor el cual arrastra todas aquellas sustancias o moléculas aromáticas que contiene el material vegetal de orégano, las cuales se recuperaron en la unidad condensadora. El aceite fue colectado en frascos ámbar burbujando con nitrógeno gaseoso antes de sellar para evitar el contacto con la luz y desplazar el oxígeno previniendo la oxidación

del aceite, el cual fue almacenado a 4 °C hasta su posterior uso (González *et al.*, 2011). Por otra parte, se determinó el rendimiento del aceite esencial según Quert *et al.* (2001) mediante la expresión:

$$P = \frac{M_1}{M_2} * 100 \quad (1)$$

Donde:

M1=masa final del aceite esencial; M2= masa inicial del follaje

100= factor matemático

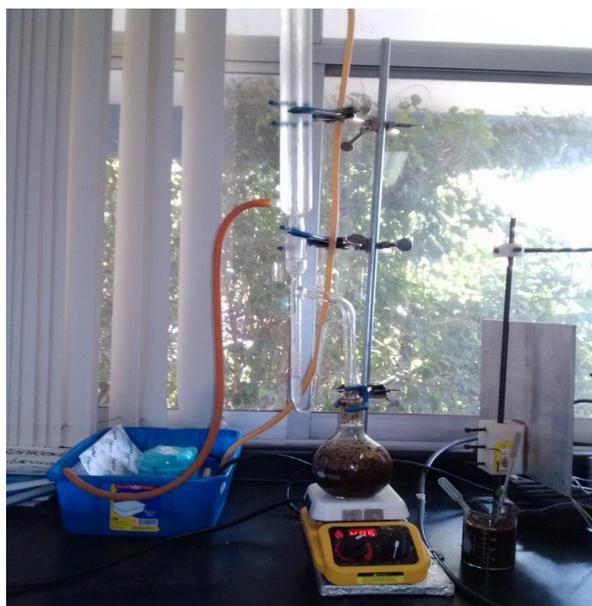


Figura 11. Equipo para hidrodestilación

6.2.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Para identificar y cuantificar la composición del aceite esencial de orégano se utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, ésta se llevó a cabo en el Centro de Graduados e Investigación en el Instituto Tecnológico de Tijuana, esta técnica permite identificar los componentes por el tiempo que tardan en pasar a través de la columna, también se emplea para

separar componentes de una mezcla que se inyectan directamente en un espectro de masas (Oxford University Press, 1997).

Se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas Agilent Technologies 7890A/5975C con una columna capilar de 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm. El equipo se operó en una rampa de columna desde 70 °C hasta 100 °C a 2 °C/min y posteriormente de 100 °C hasta 250 °C a 10 °C/min, con una dilución con gas 1:2000 y un volumen de inyección 0.5 μL. La cuantificación de los componentes del aceite fue a partir de las áreas cromatográficas de los picos obtenidos en los correspondientes cromatogramas.

6.2.3 Preparación de los complejos de inclusión β-CD/timol y β-CD/AE

Los complejos de inclusión de timol y AE fueron preparados por el método de co-precipitación (Petrović *et al.*, 2010), donde el anfitrión corresponde a la β-CD y el huésped al timol o AE, según sea el caso. Se llevaron a cabo cuatro tratamientos, donde las proporciones empleadas anfitrión: huésped fueron 95:5, 90:10, 85:15, y 80:20 p/p (Cuadro 5). En cada uno se disolvió una cantidad de β-CD (950, 900, 850 y 800 mg) en una mezcla de 10 mL de etanol/agua (proporción 1:2) a 55 °C ±2°. Una cantidad determinada de timol o de aceite esencial (50, 100, 150 y 200 mg) fue disuelta en etanol (10% p/p) y añadida a la solución de β-CD elaborada previamente. La mezcla se agitó magnéticamente manteniendo una temperatura de 55 °C, posteriormente, la mezcla se enfrió agitando durante 4 h hasta llegar a una temperatura de 25 °C. La solución fue refrigerada durante la noche a 7 °C. El precipitado se filtró a vacío, se secó en un horno de convección a 50 °C durante 24 h y el polvo fue secado a temperatura ambiente 24 h adicionales, se pesó y almacenó en frascos ámbar a temperatura ambiente para su posterior análisis.

Cuadro 5. Cantidad de β - CD, timol y aceite esencial, para la elaboración de distintos complejos de inclusión.

| Tratamiento | β -CD (g) | Timol o aceite esencial de orégano (g) |
|-------------|-----------------|--|
| 95:5 | 0.95 | 0.050 |
| 90:10 | 0.90 | 0.10 |
| 85:15 | 0.85 | 0.15 |
| 80:20 | 0.80 | 0.20 |

6.2.4 Preparación de las nanopartículas poliméricas.

Para la elaboración de las nanopartículas se empleó el polímero Eudragit L30 D55 como material de pared y el timol o AE correspondieron al activo. Dichas nanopartículas fueron preparadas por el método de desplazamiento de solvente reportado por Pool *et al.*, (2012) con pequeñas modificaciones. Brevemente, se disolvió el Eudragit (200 mg) y los CI/ β -CD de timol o AE (84 mg, β -CD= 37% con respecto al polímero y activo= 5% respecto al polímero) (Kayaci y Uyar, 2012), en 20 mL de acetona con agitación magnética durante 30 min a 25 °C. La solución resultante, fue añadida lentamente a una solución acuosa 5% de PVA (40 mL) usando una jeringa. Ambas soluciones se homogenizaron usando un homogenizador de alto corte de cizalla, Ultraturrax (IKA, T18) a 19000 RPM por 5 min; durante esta etapa, las soluciones se colocaron en un baño con hielo durante la homogeneización, con la finalidad de evitar el incremento de la temperatura debido a la velocidad del corte de cizalla. Posteriormente, la solución orgánica y el agua fueron eliminadas de la mezcla utilizando un rotaevaporador bajo condiciones de vacío por 90 min a 40 °C, hasta llegar a un volumen aproximado de 40 mL. Las nanopartículas formadas fueron lavadas tres veces empleando agua destilada y ultracentrifugando las soluciones de lavado a 20,000 RPM por 20 min a 5 °C en una ultracentrífuga (Beckman L-90). El precipitado fue resuspendido en agua destilada por 24 h y se congelaron a -72 °C en un ultracongelador

(Thermo scientific, 904). Finalmente, las nanopartículas fueron liofilizadas en una liofilizadora Labconco Freezone 12, y almacenadas en desecadores a temperatura ambiente para su posterior caracterización. En la Figura 12, se ilustra el equipo empleado para la obtención de las NPs mediante el método de desplazamiento de solvente.

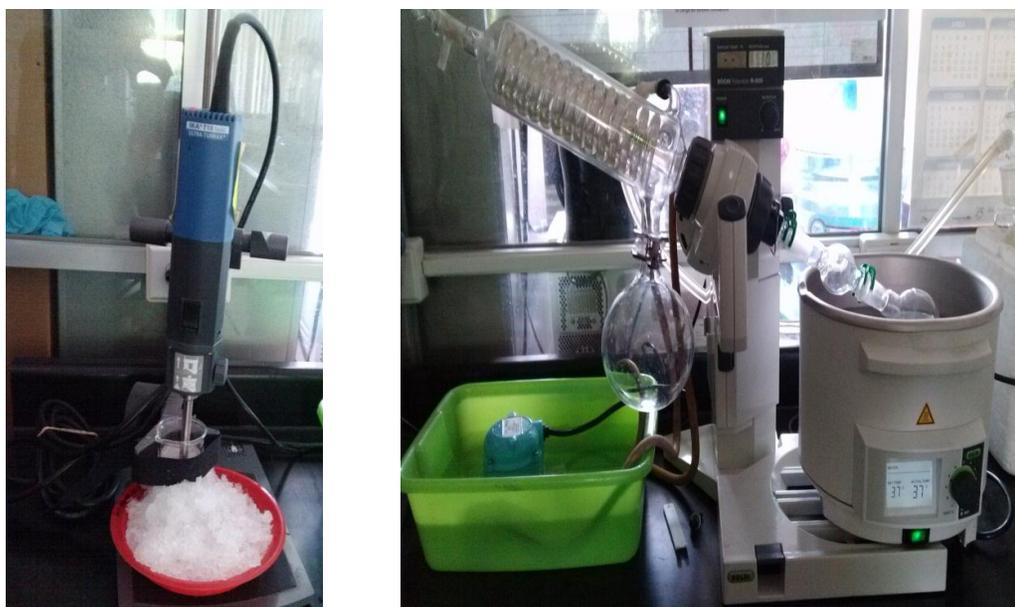


Figura 12. Equipo utilizado para la homogeneización y evaporación de solvente usando aceite esencial de orégano como activo a encapsular

6.2.5 Caracterización fisicoquímica

6.2.5.1 Tamaño de partícula

El tamaño promedio de partícula se determinó con el programa ImageJ a partir de micrografías de Microscopía Electrónica de Barrido. Los resultados se expresaron como el promedio de 100 NPs \pm la desviación estándar.

6.2.5.2 Morfología

La morfología de las nanopartículas fue evaluada por Microscopía Electrónica de Barrido (EVO-50, marca Carl 6) en el CINVESTAV campus Querétaro, la cual se basa en la formación de imágenes y contraste que resulta de

la emisión de electrones secundarios de una muestra, cuando incide un haz enfocado de electrones de alta energía (Hernández, 2002). Se resuspendió una muestra de 0.1 mg en agua destilada, posteriormente se tomó una alícuota y se resuspendió nuevamente, colocando una gota de la suspensión en una lámina de sílice, y se secó a temperatura ambiente, una vez seca la muestra, se recubrió con una capa de oro y se observaron al microscopio.

6.2.5.3 Calorimetría Diferencial de Barrido

El comportamiento térmico del timol, los complejos de inclusión y nanopartículas se determinó por Calorimetría Diferencial de Barrido (Mettler Toledo, mod.DSC822e) en el CINVESTAV campus Querétaro.

La calorimetría es una técnica experimental dinámica que permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un intervalo determinado de temperaturas. Se usan dos cápsulas o crisoles de aluminio, una contiene la muestra y la otra está vacía y es la de referencia (Suriñach *et al.*, 1992).

Se tomó una muestra de 2 mg aproximadamente y se colocó en un crisol de aluminio, sellando perfectamente antes de ponerlo en el calentador. Se aplicó una velocidad de barrido de 10 °C/min en un rango de temperatura de 40 a 210 °C (Mourtzinou *et al.*, 2008), en atmósfera de nitrógeno con una velocidad de flujo de 50 mL/min.

En los termogramas de DSC obtenidos tanto de los complejos como de las NPs, se identificaron las transiciones de fase del sistema, de eventos endo y exotérmicos. Se tomó la temperatura de fusión de ambos sistemas de encapsulación y se comparó con la β -CD y el Eudragit.

Las determinaciones se realizaron por duplicado.

6.2.5.4 Difracción de Rayos X (XRD).

La difracción de rayos X, se utilizó para detectar la formación de complejos de inclusión en estado sólido y de las nanopartículas. El patrón de difracción de un complejo de inclusión con una sustancia difiere claramente de la no complejada. Esta diferencia en el patrón de difracción indica la formación del mismo, ya que se ve alterado y también cambia la naturaleza cristalina del huésped. La formación de complejos conduce a la agudización de los picos existentes, aparición de nuevos máximos y el cambio de ciertos picos (Singh *et al.*, 2010).

Los patrones de difracción de rayos X del timol, complejos de inclusión y nanopartículas (≈ 15 mg) fueron determinados por una placa de rayos X empleando un instrumento de difracción (Diffractómetro RIGAKU, Dmax2100) con un tubo de cobre (Cu) a $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$, funcionando a 30 kV y 16 mA. Las determinaciones se realizaron por duplicado en el CINVESTAV campus Querétaro.

6.2.5.5 Espectroscopía de Infrarrojo por transformadas de Fourier mediante Reflectancia Difusa (DRIFT)

Los espectros de absorción infrarroja de timol, mezcla timol- β -CD, aceite esencial, CI β -CD/timol y CI β -CD/AE con diferentes proporciones, fueron determinadas mediante espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier con reflectancia difusa, utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo Spectrum GX de Perkin Elmer con Microscopio acoplado AutoIMAGE, en el CINVESTAV Querétaro. Se mezcló cada una de las muestras con bromuro de potasio, moliéndolas en un mortero ágata, el espectrofotómetro fue utilizado en un rango de 4000 a 0 cm^{-1} .

6.2.5.6 Voltamperometría Diferencial de Pulso (VDP).

Esta técnica fue empleada para corroborar la formación de los complejos de inclusión y NPs, determinar la eficiencia de encapsulación, la capacidad antioxidante y evaluar la liberación del aceite tanto de los complejos de inclusión como de las nanopartículas.

6.2.5.6.1 Formación de los complejos de inclusión

Para corroborar la formación de los complejos de inclusión y NPs a través de VDP se realizaron algunas modificaciones a lo reportado por Mora *et al.* (2009), se empleó un equipo BAS-Epsilon (modelo C-3) y un sistema de celda de tres electrodos a la que se incorporó un electrodo sólido estacionario (carbón vítreo) como electrodo de trabajo, un electrodo de Ag/AgCl (3M KCl) como electrodo de referencia y un electrodo auxiliar de alambre de platino (Figura 13). Los experimentos de VDP se realizaron en soluciones dexoginadas por burbujeo de nitrógeno gaseoso puro previamente. Antes de cada experimento, el electrodo se pulió con una lija utilizando una suspensión de alúmina y se enjuagó con agua desionizada después de cada experimento. Los parámetros utilizados fueron una amplitud de pulso de 70 mV y una velocidad de barrido de 5 mV/s. Se colocó una cantidad determinada de la muestra en solución amortiguadora Sörensen pH 5, y se registró el desplazamiento en el potencial de oxidación, el cual indica la formación de los complejos y las NP's, ya que las moléculas se desplazan hacia la superficie del electrodo a través de un proceso de difusión, las moléculas más grandes tardan más tiempo en llegar a la superficie de éste, registrando un desplazamiento en el potencial de oxidación.

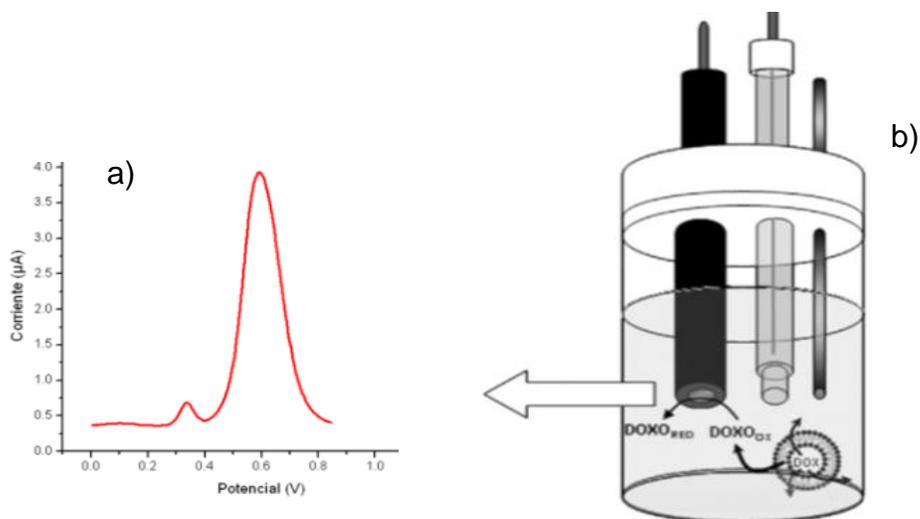


Figura 13. a) Voltamperograma típico del aceite esencial libre, b) Ilustración esquemática de la celda electroquímica

6.2.5.6.2 Eficiencia de Encapsulación

Para la evaluación de la eficiencia de encapsulación (EE%) se siguió la metodología descrita por Mora *et al.* (2009) con algunas modificaciones, descrita en la sección 6.2.5.6.1 (Formación de los complejos). Se dispersó una alícuota de complejos y nanopartículas (≈ 1 mg), en 1 mL de DMSO durante 48 h con agitación magnética en un vial ámbar para evitar la degradación del AE o el timol con el contacto con la luz, burbujeando con nitrógeno gaseoso antes de sellar el vial. Posteriormente, 30 μ L de la solución fue añadida en la celda electroquímica con 4 mL de una solución amortiguadora Sörensen pH 5. Las corrientes (I/ μ A) obtenidas por la presencia de timol y aceite esencial liberados de los complejos y de las NPs de Eudragit, se interpolaron en curvas de calibración previamente elaboradas para cada compuesto, evaluando la corriente contra concentración. La eficiencia de encapsulación de complejos y NPs se determinó mediante la ecuación 2 (Mourtzinis *et al.*, 2008)

$$EE(\%) = \frac{\text{Total encapsulado}}{\text{Cant total en la formulación}} \times 100 \quad (2)$$

6.2.5.6.3 Cinéticas de liberación

Las pruebas de liberación *in vitro* del activo, tanto de los complejos de inclusión como de las nanopartículas se realizaron con estudios electroquímicos siguiendo el protocolo descrito en la sección 6.2.5.6.1 (Formación de los complejos). El sistema se mantuvo en agitación durante 32 h, para provocar la difusión de las moléculas de los antioxidante hacia el medio de dispersión, monitoreando a distintos tiempos (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 26, 28, 30 y 32 h). El ensayo de liberación se realizó en una solución amortiguadora Sörensen a tres pH diferentes, simulando las condiciones de acidez del estómago (2 y 4.5) y del intestino delgado (7.2). Brevemente, una muestra de complejos o nanopartículas (1 mg) se añadieron a 1 mL de solución amortiguadora Sörensen (pH ajustado a 2, 4.5 y 7.2 usando HCl), se agitaron magnéticamente durante 32 h. La cantidad de aceite esencial liberado se monitoreó con VDP, donde la corriente está directamente relacionada con la concentración, por lo tanto entre mayor sea la corriente mayor es la concentración de compuesto evaluado. Con la finalidad de mantener la estabilidad química del aceite liberado del sistema de encapsulación durante los experimentos, la solución Sörensen se desoxigenó después de cada experimento, burbujeando con nitrógeno gaseoso durante 5 min para eliminar la presencia de oxígeno molecular que pudiera oxidar a los compuestos encapsulados.

6.2.5.7 Capacidad antioxidante

6.2.5.7.1 Método ABTS

La estimación de la Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) se realizó utilizando el ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, por sus siglas en inglés) descrito por Nenadis *et al.*, (2004). El método se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos. Brevemente, una alícuota de 20 μ L de las muestras se mezcló con 230 μ L de solución de ABTS•+ preparada previamente. Los controles contenían todos los reactivos de la reacción, excepto las muestras o Trolox. La absorbancia fue registrada a 734 nm en 0, 6, 10, 30, 60

y 90 minutos en un lector de microplacas modelo SpectraMax. El porcentaje de absorbancia de inhibición se calculó de acuerdo con la ecuación 3. Los resultados fueron expresados como TEAC, este valor se calculó empleando una curva de calibración de Trolox y se expresó como micromol de Trolox por miligramo de muestra.

$$\text{Inhibición (\%)} = (1 - \text{Amuestra}/\text{Acontrol}) \times 100 \quad (3)$$

Donde Amuestra es la absorbancia de la muestra y Acontrol es la absorbancia del control.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención y caracterización del aceite esencial de orégano.

El rendimiento del aceite esencial se determinó empleando la masa final del aceite obtenido y la masa inicial del follaje de orégano. Se obtuvieron 900 μL de aceite esencial por cada 30 g de material vegetal seco, siendo un rendimiento del 2.7 % aproximadamente.

La cantidad de compuestos volátiles del AE de orégano se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El aceite esencial obtenido presentó un 68.42% de carvacrol, siendo el compuesto mayoritario del aceite, un 19.01 % de m-cimeno, 4.25 % de 2-ter-Butil-4-hidroxianisol, 2.31 % de timol, entre otros compuestos (Figura 14). Estos resultados difieren de lo reportado por Arango *et al.*, (2012) para *Lippia organoides* H. B. K., donde el compuesto mayoritario fue timol (73.7 %), y fueron similares a lo reportado por Baydar *et al.*, (2004), donde el compuesto mayoritario fue carvacrol (86.9 %), seguido de γ -terpineno (3.9 %), cimeno (2.9) y timol (0.2 %). Esto se debe a que la composición química de los aceites esenciales depende de las especies de las cuales se extrae dicho aceite, factores climáticos, condiciones geográficas y el periodo de cosecha; y su actividad antioxidante y antimicrobiana depende del tipo y concentración de cada componente.

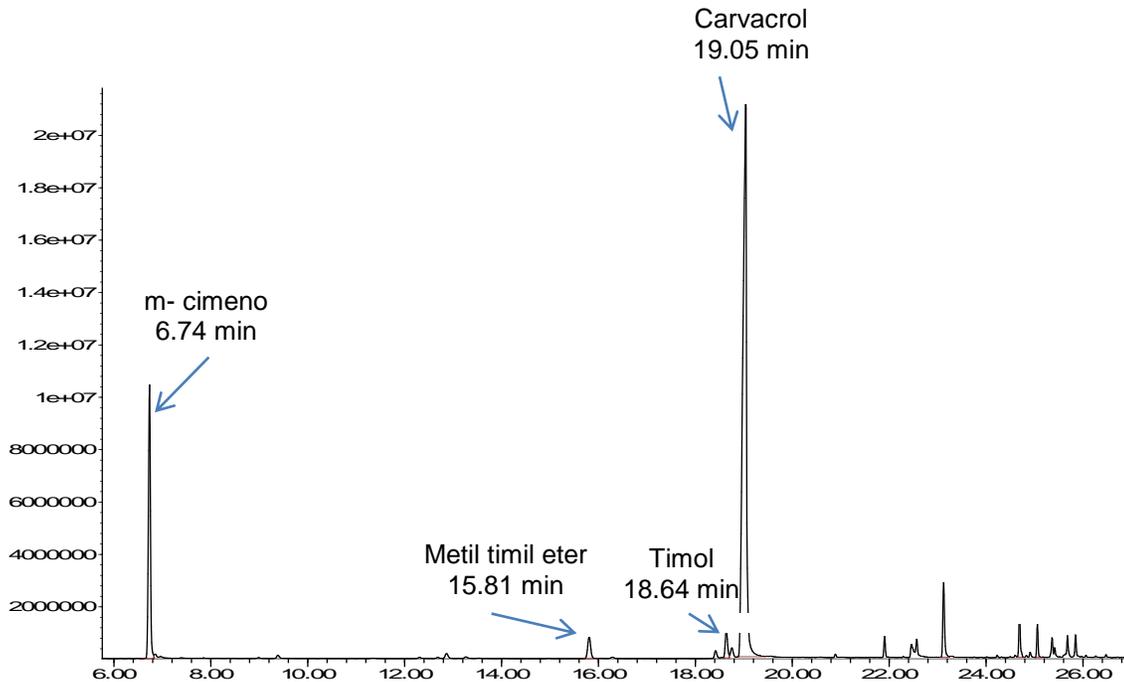


Figura 14. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del aceite esencial de orégano.

7.2 Complejos de inclusión β - CD/timol y β - CD/AE

El método de co-precipitación permitió la obtención en promedio de 0.82 g de complejos de inclusión con β - CD de cada gramo empleado (entre las β - CD y el activo), es decir se tuvo un rendimiento del 82% aproximadamente.

7.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es un método de rutina, comúnmente utilizado para verificar la formación de un complejo en estado sólido (Karathanos *et al.*, 2007). Después de que los complejos de CD se forman desaparecen una serie de eventos térmicos de moléculas huésped, esto se toma como una prueba de la inclusión molecular. Los termogramas obtenidos por DSC para β -CD, complejos de inclusión β -CD/AE en diferentes proporciones (95:5, 90:10, 85:15 y 80:20 p/p), se muestran en la Figura 15. En la curva de la β -CD (15 A) se observa un evento endotérmico alrededor de 90 °C debido probablemente por la

evaporación de moléculas de agua, y un máximo a una temperatura arriba de 150 °C, este comportamiento se presenta para todos los tratamientos. Mourtzinou *et al.* (2008) y Peggy *et al.*, (2010) observaron el mismo comportamiento en los termogramas de β -CD. Subsecuentemente, en los termogramas β -CD/AE se observó un pico endotérmico menos agudo y desplazado hacia temperaturas mayores para todos los tratamientos respecto a la β -CD pura (Figura 15 B a 15 E), este comportamiento se debe posiblemente a que hay interacciones entre las β -CD y el AE.

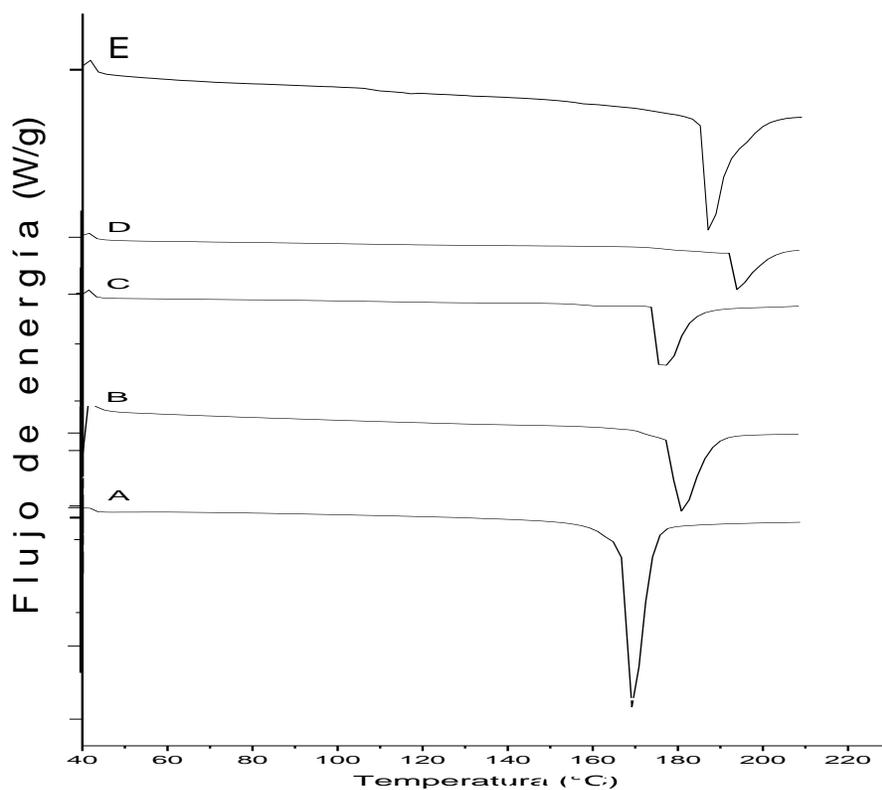


Figura 15. Termogramas de Calorimetría Diferencial de Barrido de β -CD (A); y complejos de inclusión β -CD/AE a diferentes proporciones 95:5 (B), 90:10 (C), 85:15 (D) y 80:20 (E).

7.4 Difracción de rayos X (XRD)

Se realizaron estudios de XRD para investigar la estructura cristalina de los CI β - CD/timol y de los CI β - CD/AE. Los patrones de XRD de la β - CD y sus complejos de inclusión con timol (Figura 16), tienen picos característicos en el intervalo $2\theta = 5$ - 40° . El timol es un material cristalino con picos afilados desde 7.99° hasta 31° ; en la figura 16 F, se observaron varios picos afilados en 8.87° , 10.65° , 12.72° y 19.52° los cuales indican el carácter cristalino de la β - CD. Todos los patrones de difracción de rayos X, de los CI β - CD/timol mostraron una organización cristalina, y en general se muestran picos similares entre 5° y 30° . Sin embargo, se presentan numerosos picos agudos enfatizando el carácter cristalino de los CI, indicando que el material era principalmente cristalino. Por otra parte, en los CI el pico del timol presente a $2\theta = 7.99^\circ$ desaparece, esto puede sugerir que se obtuvo una complejación exitosa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Kayaci y Uyar (2011), quienes formaron CI β - CD/vainillina, obteniéndose CI de naturaleza cristalina.

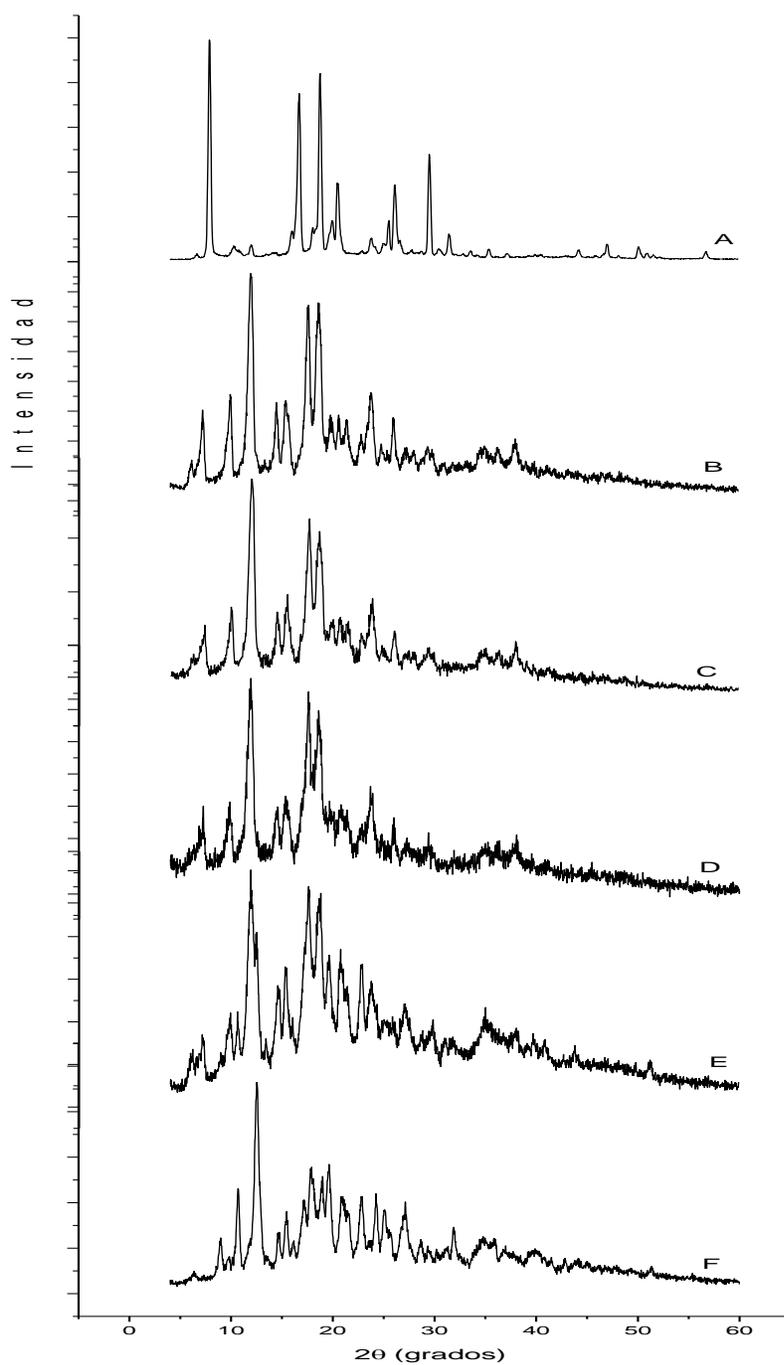


Figura 16. Difractogramas de rayos X de timol (A), CI β-CD/timol 80:20 (B), CI β-CD/timol 85:15 (C), CI β-CD/timol 90:10 (D), CI β-CD/timol 95:5 (E) y β-CD (F).

En cuanto a los CI β -CD/AE, se evaluó el estado físico en el que se encontraba disperso el aceite de orégano en los complejos, los patrones de difracción confirmaron los resultados obtenidos en DSC. El patrón de XRD de los complejos es distinto al de sus componentes. Los difractogramas de la β -CD y los complejos de inclusión β -CD/AE exhibieron una serie de líneas finas e intensas, las cuales son indicadores de la cristalinidad. La β -CD mostró picos intensos y nítidos (Figura 17 A) a 6.35° , 8.97° , 10.51° , 12.54° , 14.71° , 15.49° , 17.84° , 18.89° , 19.58° , 20.89° , 22.81° , 24.29° , 25.07° y 27.08° , los cuales indican el carácter cristalino de la β -CD. Picos semejantes han sido reportados por varios autores Choi *et al.*, (2009). Los difractogramas de los complejos (Figura 17 B, C, D y E) mostraron la desaparición de algunos picos, y la aparición de nuevas líneas, incluyendo líneas débiles y una intensa línea en 6.95° (2θ), indicando la presencia de un nuevo sólido cristalino que corresponde a un complejo de la misma naturaleza.

Todos los complejos de inclusión mostraron una organización cristalina, y muestran picos similares entre 5 y 30° . Sin embargo, se observó que el número de picos disminuyó conforme incrementó la cantidad de aceite. Esto puede indicar que el aceite de orégano, puede afectar la forma cristalina de las β -CD. Sin embargo en el tratamiento 80:20 no se tuvo el mismo comportamiento, esto probablemente se debe a que fue el tratamiento con menor eficiencia de encapsulación, indicando que se perdió una gran cantidad de aceite durante el proceso de elaboración de los CI. De este modo, la difracción de rayos X, corroboró los resultados obtenidos en los estudios electroquímicos y la calorimetría diferencial de barrido.

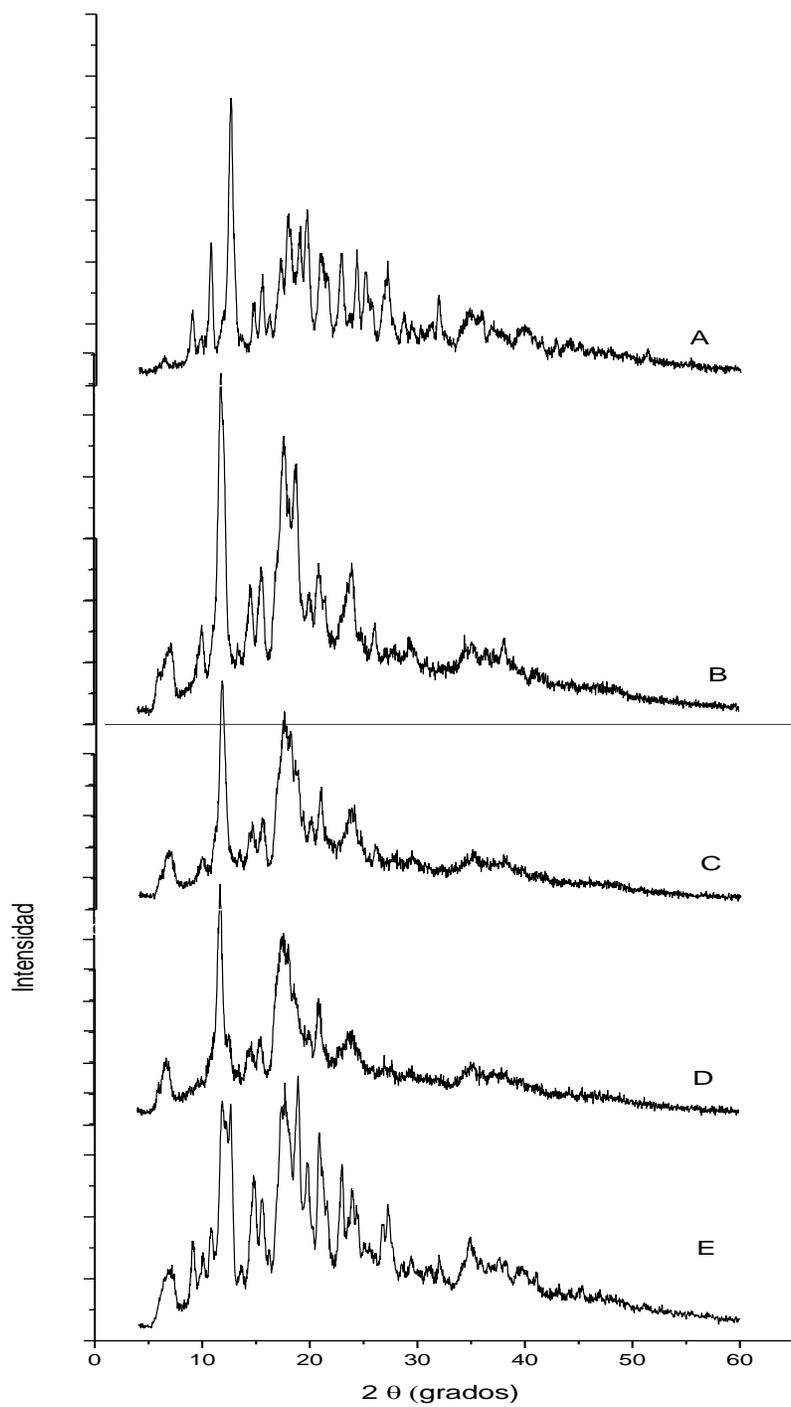


Figura 17. Difractogramas de Rayos X para β -CD (A); CI β -CD/AE 95:5 (B), CI β -CD/AE 90:10 (C), CI β -CD/AE 85:15 (D) y CI β -CD/AE 80:20 (E).

7.5 Espectroscopía de Infrarrojo por transformadas de Fourier mediante Reflectancia Difusa (DRIFT)

DRIFT es una técnica muy útil para el análisis de polvos o líquidos, permitiendo el estudio de los cambios en las características espectrales de las moléculas huésped (Calabro *et al.*, 2004).

Para analizar la fuerza impulsora entre el timol y la β -CD en el proceso de formación de los complejos, se utilizó FTIR. En la Figura 18, se muestran los resultados de dicho análisis; donde se observan los picos característicos del timol (Figura 18 A) y β -CD (Figura 18 B) en un campo de 4000 a 0 cm^{-1} , la vibración del timol (Figura 18 A) a 2959.7 cm^{-1} y 1458.29 cm^{-1} son derivadas de los grupos CH_3 y CH_2 del timol, respectivamente. 1621.44 cm^{-1} , 1590.28 cm^{-1} y 1458.29 cm^{-1} , corresponden al grupo aromático. 802.01 cm^{-1} y 855.17 cm^{-1} a partir del 1,2 4-benceno sustituido. Para los complejos formados con las diferentes proporciones de timol: β -CD, el pico intenso característico 802.01 cm^{-1} no se observó, por tanto la desaparición del pico típico indica en algún grado, que el anillo aromático del timol se incluyó en la cavidad de las β -CDs, además el timol libre mostró intensos y afilados picos en comparación con todos los tratamientos, de este modo, las diferencias indicaron la formación exitosa de los complejos de inclusión β -CD/timol. Estos resultados coinciden con lo reportado por Chai *et al.* (2011), quienes observaron el mismo comportamiento al elaborar complejos de inclusión con β -CD y timol.

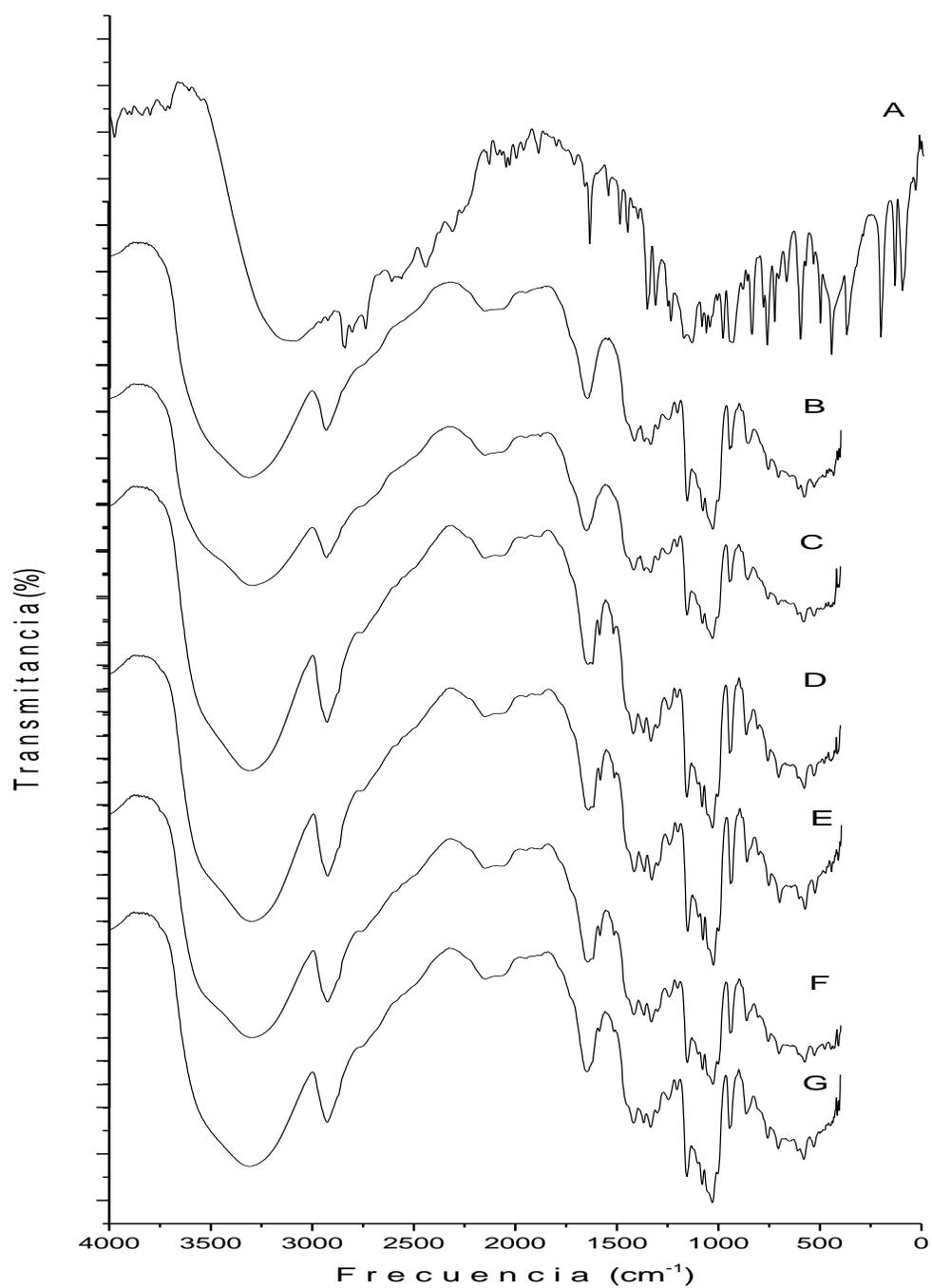


Figura 18. Espectros de DRIF para timol (A), β-CD (B); mezcla timol y β-CD (C), CI β-CD/timol 80:20 (D), CI β-CD/timol 85:15 (E), CI β-CD/timol 90:10 (F) y CI β-CD/timol 95:5 (G).

Por otra parte, mediante el análisis IR se confirmaron interacciones moleculares entre los componentes del AE y las β -CD. La Figura 19 muestra los espectros de IR para AE, β -CD y CI β -CD/AE a diferentes proporciones de AE. Para el AE se observaron algunas bandas características de sus constituyentes al igual que para las β -CD. En el AE (Figura 19 A), la vibración ocurre alrededor de 2954.9 cm^{-1} y 1457.9 cm^{-1} derivadas de $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$ del grupo timol, respectivamente. 1619.3 cm^{-1} , 1588.6 cm^{-1} , 1520.8 cm^{-1} , del grupo aromático de timol y 806.6 cm^{-1} , 863.15 cm^{-1} , a partir de 1,2,4 benceno sustituido. El AE en comparación con la β -CD y los CI β -CD/AE presentó picos intensos y afilados. Sin embargo, el pico típico intenso de 806.6 cm^{-1} no se pudo observar en los CI β -CD/AE (Figura 19 B, C, D y E); lo que indica la formación exitosa de los CI. En comparación con la β -CD, los CI β -CD/AE tenían dos picos cortos más en 1102.95 y 999.1 . Por tanto las diferencias indicaron la formación exitosa de los CI β -CD/AE.

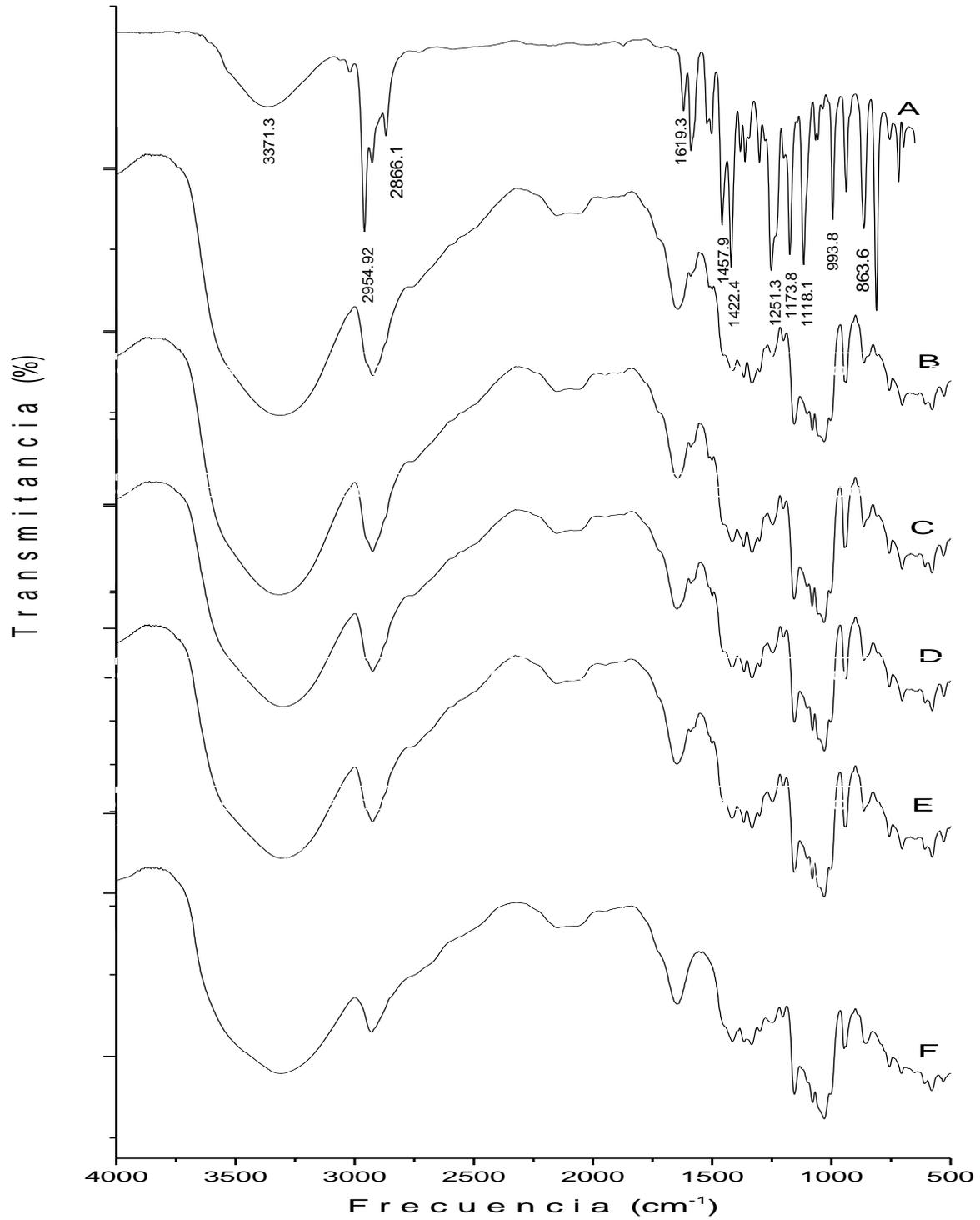


Figura 19. Espectros de DRIF para AE (A), CI β -CD/AE 80:20 (B), CI β -CD/AE 85:15 (C), CI β -CD/AE 90:10 (D), CI β -CD/AE 95:5 (E) y β -CD (F).

7.6 Voltamperometría Diferencial de Pulso (VDP).

En la Figura 20 se presentan los voltamperogramas para el aceite esencial libre y los CI β -CD/AE a diferentes concentraciones. El aceite esencial presenta dos picos de oxidación a 337 y 590 mV vs AgCl, respectivamente (Cuadro 6). Estas respuestas pueden adscribirse a los procesos de oxidación de las moléculas de timol y carvacrol. Para el caso de todos los CI β -CD/AE se observó un desplazamiento positivo en el potencial de oxidación respecto al potencial del aceite libre, esto sugiere la inclusión de las moléculas electroactivas del aceite en la β -CD, y es más difícil oxidarlas. Por otra parte, se presenta una disminución de la intensidad del pico de la corriente. Sin embargo se observó que para cada tratamiento, la corriente disminuyó en diferentes proporciones, esto se debe a que dicho parámetro está en función de la concentración del activo, por lo que dicha disminución en la corriente puede deberse a que el activo no se ha liberado completamente de la cavidad de la β -CD. Un comportamiento similar se observó por Da Rocha *et al.* (2010), quienes evaluaron el comportamiento electroquímico de la manguiferina, un compuesto antioxidante natural, y sus complejos con β -CD, donde encontraron que los complejos de inclusión presentaron un cambio positivo en el potencial.

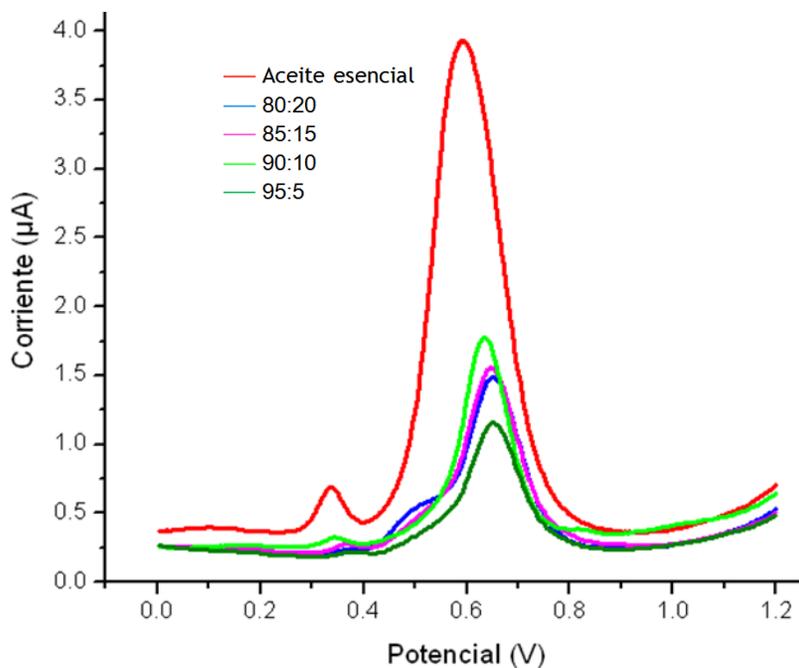


Figura 20. Voltamperometría Diferencial de Pulso de complejos de inclusión β -CD/AE a diferentes concentraciones en solución amortiguadora Sørensen pH 5. Velocidad de barrido 5 mV/s.

Cuadro 6. Potencial de oxidación del aceite esencial y sus complejos de inclusión a diferentes proporciones

| | Pico 1 | Pico 2 |
|-------|----------------|----------------|
| | Potencial (mV) | Potencial (mV) |
| AE | 337 | 590 |
| 80:20 | 372 | 650 |
| 85:15 | 367 | 648 |
| 90:10 | 347 | 637 |
| 95:5 | 380 | 653 |

7.6.1 Eficiencia de encapsulación (EE%)

La EE se evaluó con VDP, donde se colocó una muestra de los CI β -CD/timol y CI β -CD/AE en DMSO, respectivamente, durante 48 h burbujeando con nitrógeno puro previamente, para de manera posterior colocar una alícuota en solución amortiguadora Sörensen a pH 5 para su análisis correspondiente.

Se observó diferencia estadística ($\alpha=0.5$) entre tratamientos tanto para los CI β -CD/timol como para los CI β -CD/AE, es decir la EE está en función de la proporción β -CD: timol y β -CD: AE empleada, obteniéndose valores entre 74.7-93.69 % y 78.10- 95.19%, respectivamente (Cuadro 7). Mourtzinos *et al.*, (2008) para CI β -CD/timol reportan una EE del 96%, resultados similares a los obtenidos en este trabajo (93.6%) para el tratamiento 85:15.

Por otro lado, los resultados obtenidos para la EE en los CI β -CD/AE difieren a lo reportado en la literatura; donde se obtuvieron valores de EE menores a 81% para CI β -CD/AE de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) a diferentes proporciones (75:25, 70:30, 60:40 aproximadamente) (Arana *et al.*, 2010), esto indica que la eficiencia de encapsulación está directamente relacionada con las proporciones empleadas para la elaboración de los complejos de inclusión. Además, Petrović *et al.*, (2010) reportan que la mejor EE obtenida para CI β -CD/AE de canela fue para el tratamiento 85:15; mientras que en esta investigación el mejor tratamiento fue el de 90:10, este parámetro también depende del tipo de compuestos presentes en el aceite y del método utilizado para la elaboración de los complejos.

Cuadro 7. Eficiencia de encapsulación de CI β -CD/timol y CI β -CD/AE

| Tratamiento | CI β -CD/timol (%) | CI β -CD/AE (%) |
|-------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 80:20 | 78.90 \pm 3.5 ^{ab} | 78.10 \pm 1.08 ^b |
| 85:15 | 93.69 \pm 6.2 ^a | 86.91 \pm 7.80 ^{ab} |
| 90:10 | 84.40 \pm 2.9 ^{ab} | 95.19 \pm 4.0 ^a |
| 95:5 | 74.77 \pm 1.0 ^b | 91.11 \pm 5.91 ^{ab} |

Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes por duplicado. Datos expresados como la media \pm desviación estándar. Valores con diferente letra indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) (prueba de Tukey).

7.7 Perfiles de liberación de complejos de inclusión β -CD/AE (proporción 90:10)

Para realizar el estudio del perfil de liberación, se seleccionó el tratamiento que presentó la mayor eficiencia de encapsulación, es decir, el tratamiento 90:10. Los perfiles de liberación del aceite esencial fueron evaluados empleando la técnica de VDP. Las señales de oxidación del aceite de los diferentes tratamientos fueron monitoreadas durante 32 horas, donde el tiempo es acumulativo. Conforme el AE es liberado, la corriente de las señales de oxidación se incrementa. En la Figura 21, se muestran los perfiles de liberación del AE de los complejos de inclusión (relación 90:10) a diferentes pH's (2, 4.5 y 7.2), los cuales simulan las condiciones de acidez del estómago (2 y 4.5) y del intestino (7.2), donde se aprecia que la liberación es dependiente del pH en que se encuentran los complejos, en este caso a pH 7.2 se liberó alrededor de un 35% del activo, mientras que a pH 2 a la 0.25 h se liberó el 85% aproximadamente, observando la influencia que tiene el pH en el proceso de liberación, siendo mayor la velocidad de liberación a pH ácidos.

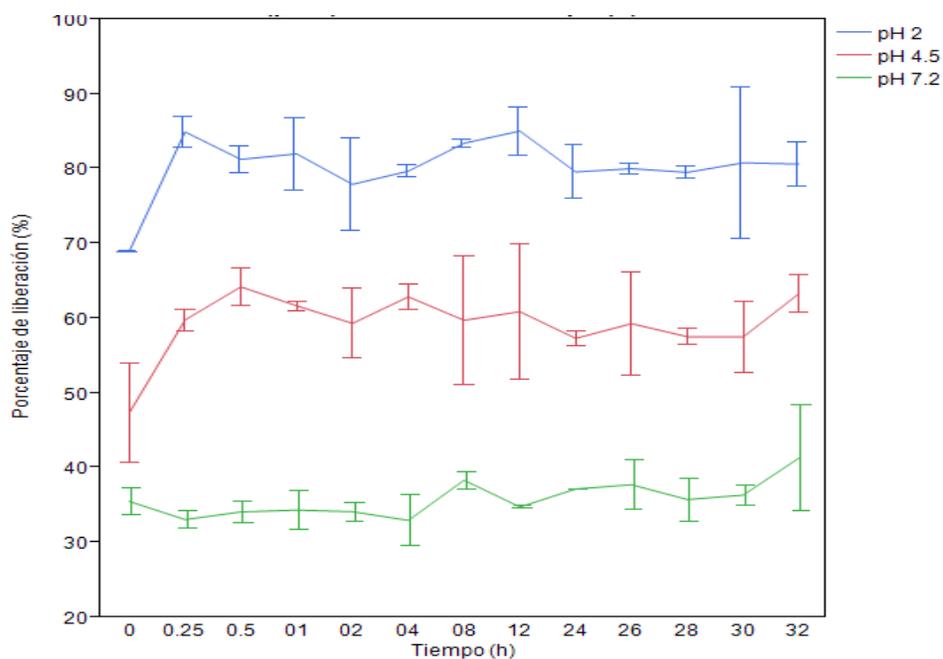


Figura 21. Cinéticas de liberación de AE desde CI con β -CD en solución amortiguadora Sørensen a pH 2, 4.5 y 7.2, durante 32 h. Resultados expresados como la media \pm desviación estándar de tres repeticiones con dos réplicas.

7.8 Capacidad antioxidante

7.8.1 Método ABTS

La capacidad antioxidante de los CI β -CD/timol y β -CD/AE evaluada mediante una cinética por el método ABTS, está en función del tiempo (Figura 22).

La capacidad antioxidante en los distintos tratamientos fue diferente estadísticamente ($\alpha=0.05$), la cual estuvo en función del pH y del tiempo transcurrido durante la cinética. Para el pH 2, se observó que desde el minuto cero la capacidad antioxidante del aceite libre está por debajo de la que presentaron los CI- β -CD/AE, donde evidentemente el pH influyó, por lo que al formar complejos de inclusión se mejora la capacidad antioxidante del AE. Sin embargo, ésta fue menor comparada con la obtenida a pH 4.5 y 7.2, esto se debe a que si bien la capacidad antioxidante se ha relacionado con el número de grupos hidroxilo en la molécula, también se ha relacionado con la posible influencia del pH, es decir la desprotonación del hidroxilo (Di Majo *et al.*, 2011).

Por otra parte, para el pH 4.5 y 7.2 (Figura 22 b y 22 c), en los primeros minutos (6 min), se observó una notable disminución de dicha capacidad, con respecto al AE libre. No obstante, a partir de este tiempo los complejos de los tratamientos 85:15 y 90:10 obtuvieron valores por encima del AE libre, lo cual sugiere que la formación de los complejos no sólo conserva la capacidad antioxidante del AE, sino que la mejora, obteniendo valores en una cinética de 90 minutos desde 33.37-604.84 y 178.83-711.33 μ moles equivalente a trolox/mg, para cada pH respectivamente, comparados con el aceite libre (pH 4.5: 208.14-545.75, pH 7.2: 541.43- 604.05 μ moles equivalente a trolox/mg).

Para los CI β -CD/timol a pH 7.2 (Figura 22 d), se observó que la capacidad antioxidante fue incrementando conforme transcurrió el tiempo, a los 6 min se obtuvieron valores de 255 a 343 μ moles equivalente a trolox/mg para los distintos tratamientos; y a los 90 minutos se obtuvieron valores entre 636 y 680 μ moles equivalente a trolox/mg, donde el mejor tratamiento de los CI fue el de 90:10. Algo muy importante es que la formación de los CI mejoran la capacidad antioxidante del timol.

Los resultados de los CI β -CD/timol, son superiores a lo reportado por Miguel *et al.*, (2009) donde se obtienen valores alrededor de 184 μ moles equivalente a trolox/mg en CI β -CD/timol a los 6 min.

Por otra parte, la disminución de la capacidad antioxidante de los diferentes tratamientos de CI β -CD/AE respecto al AE libre a pH 7.2, a los 6 minutos (Figura 22 c), puede deberse a que el activo se va liberando poco a poco; este proceso dinámico depende de las condiciones del medio en el que se encuentren los complejos, el cual favorece o desfavorece la liberación y en consecuencia la actividad biológica del AE.

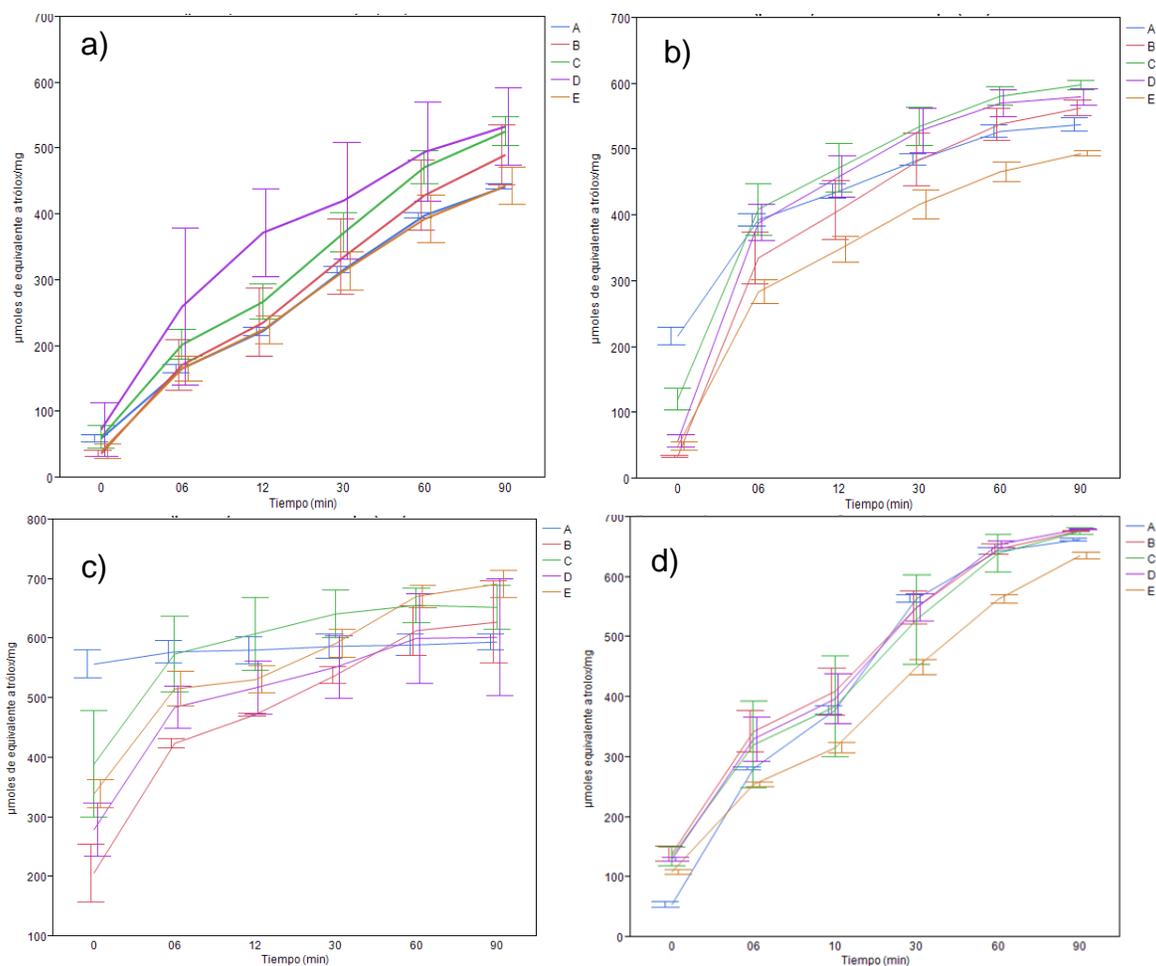


Figura 22. Cinéticas de capacidad antioxidante de complejos de inclusión β -CD/AE (relación β - CD: AE; A: aceite esencial libre, B: 80:20, C: 85:15, D: 90:10, E: 95:5) en solución amortiguadora Sørensen a diferentes pH a) 2, b) 4.5 y c) 7.2 y CI β - CD/timol (relación β - CD: timol; A: timol, B: 80:20, C: 85:15, D: 90:10, E: 95:5) a pH 7.2 (d) durante 90 min por el método ABTS. Resultados expresados como la media \pm desviación estándar con tres repeticiones por triplicado.

7.8.2 Método VDP

En la Figura 23, se muestran los voltamperogramas diferenciales de pulso y los potenciales de oxidación de los CI β -CD/AE con la proporción 90:10, ya que fue el tratamiento que presentó la mayor eficiencia de encapsulación. Se observa que conforme incrementa el pH, los potenciales de oxidación son desplazados a

valores menos positivos, lo cual se traduce en una mayor capacidad antioxidante. De manera adicional se presenta disminución de la corriente.

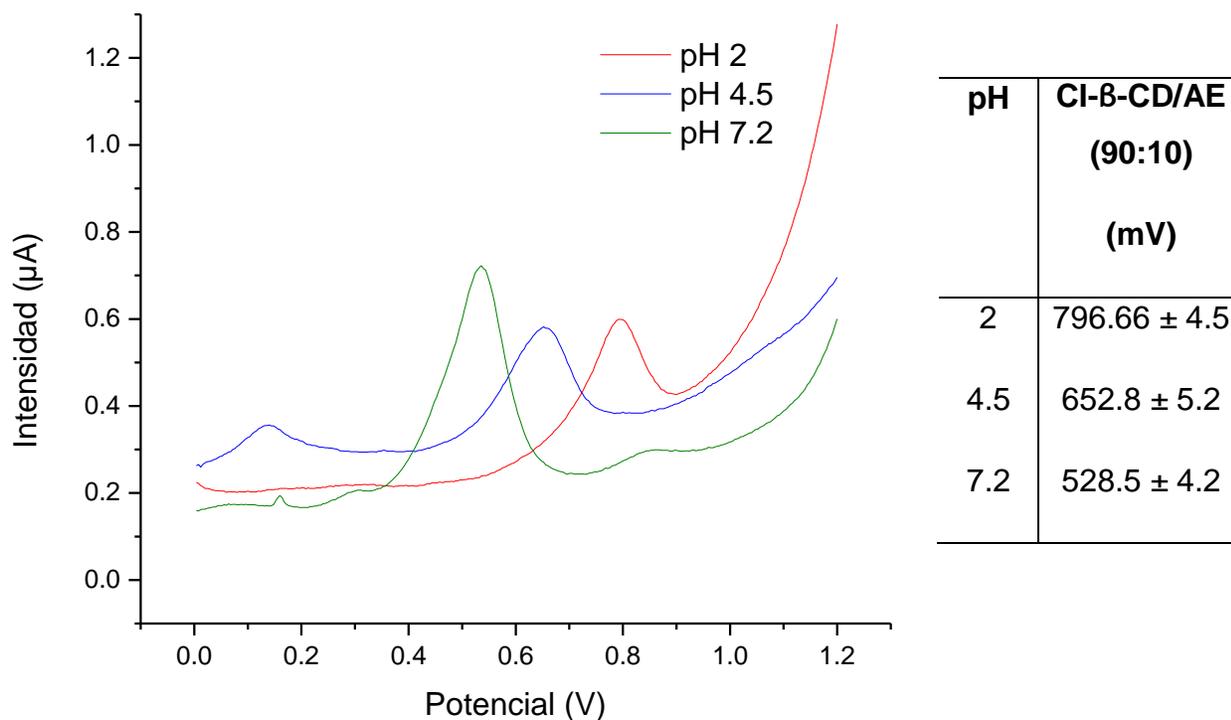


Figura 23. Voltamperograma Diferencial de Pulso de CI-β-CD/AE a pH 2, 4.5 y 7.2.

7.9 Obtención y caracterización de las nanopartículas poliméricas

7.9.1 Tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación (EE%)

Se obtuvieron partículas con matriz de pared de Eugradit L30 D55 libres, y cargadas con timol, aceite esencial de orégano y complejos de inclusión (proporción 90:10). Se evaluó el tamaño promedio de partícula, característica que está estrechamente relacionada con la funcionalidad de dichos sistemas de liberación controlada. Los tamaños de las NPs promedio obtenidos, se encontraron entre 118 y 153 nm (Cuadro 8) y hubo diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los diferentes tipos de NPs.

Song *et al.* (2008) mencionan que el tamaño de las NPs depende de diversos factores como la concentración del polímero, concentración del activo encapsulado, y la concentración del surfactante, ya que influye en la viscosidad de la solución y por ende en el corte de cizalla, provocando una variación en el tamaño de partícula.

Cuadro 8. Tamaño promedio de nanopartículas placebo, cargadas con timol, con AE y con CI- β CD/AE.

| NPs | Diámetro (nm) |
|------------------------|--------------------------------|
| Placebo | 118.5 \pm 31.3 ^c |
| Eud/timol | 152.27 \pm 12.4 ^a |
| Eud/AE | 123.22 \pm 26.1 ^c |
| Eud/CI- β -CD/AE | 133.34 \pm 24.0 ^b |

En cuanto a la eficiencia de encapsulación, ésta se evaluó con VDP, colocando una muestra de las NPs en DMSO con agitación magnética durante 48 h, burbujeando con nitrógeno líquido previamente, luego se colocó una alícuota en solución amortiguadora Sørensen a pH 5 para el análisis correspondiente. El porcentaje de EE de las NPs Eud/AE (56 \pm 1.76) y Eud/CI β -CD/AE (53 \pm 1.39) fueron muy similares, lo que sugiere que la formación de la doble encapsulación no afecta a dicho parámetro. Estos resultados difieren de lo reportado por Pool *et al.* (2012), quienes obtuvieron NPs de Eud cargadas con quercetina (67.9 %) y catequina (78.1%), teniendo eficiencias de encapsulación mayores, esto se debe probablemente a que el aceite esencial es muy volátil, además los CI β -ciclodextrina/AE tienen propiedades hidrofílicas, característica por la cual se pierde una gran parte de estos durante el proceso de elaboración de NPs.

7.9.2 Microscopía Electrónica de Barrido

La morfología de las NPs liofilizadas se estudió mediante microscopía electrónica de barrido. En la Figura 24, se muestran las imágenes de microscopía electrónica de barrido de NPs placebo de Eudragit L30 D55 (a), cargadas con timol (b), cargadas con AE (c) y NPs cargadas con CI- β -CD/AE (d). Para todos los casos, se observan algunos conglomerados, y en general, se tiene forma aparentemente esférica y tamaño de las NPs similar entre cada tratamiento.

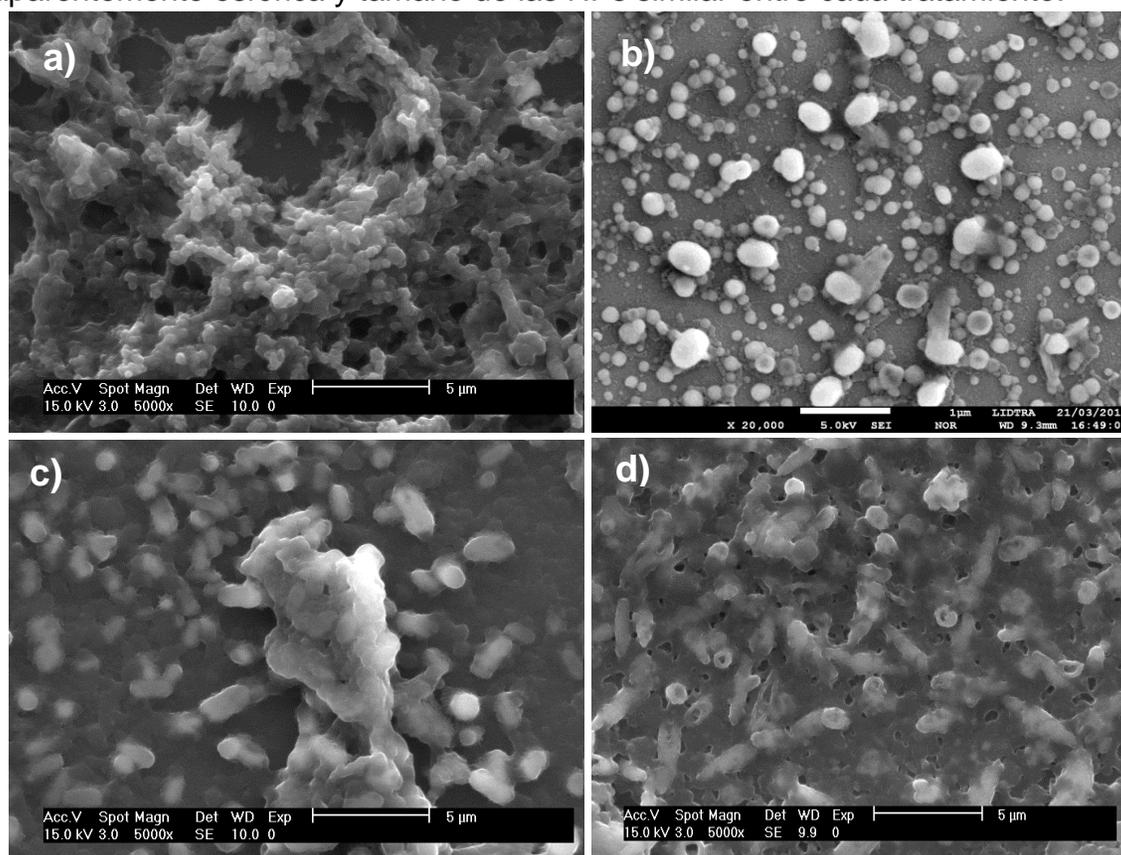


Figura 24. Micrografías (SEM) de NPs placebo de Eudragit L30 D55 a 5000X (a) y cargadas con timol a 20000X (b), NPs de AE a 5000X (c) y cargadas con CI- β -CD/AE a 5000X (d).

La organización estructural de las moléculas del aceite esencial y la matriz polimérica en las NPs fue determinada mediante los métodos de calorimetría diferencial de barrido (DSC), difracción de rayos X, espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier y Reflectancia Difusa (DRIFT).

7.9.3 Calorimetría Diferencial de Barrido

Una de las principales aplicaciones de la DSC es el análisis del estado físico de los sistemas formados, es decir, en qué forma se encuentra disperso el activo dentro de las NPs poliméricas, esta información permite tener una noción de la estabilidad y liberación de los activos encapsulados. En la Figura 25 se presentan los termogramas obtenidos para Eudragit, NPs cargadas con CI β -CD/AE, mezcla física entre CI β -CD/AE y eudragit, NPs placebo y NPs AE libre. En cuanto al Eudragit (Figura 25 A), se pueden observar tres transiciones de fase en 75 y 211 °C, las cuales corresponden a la Tg y a la disociación de puentes de hidrógeno del polímero, respectivamente. Del mismo modo, las transiciones que se presentan en la mezcla física (Figura 25 B) fueron semejantes a las observadas en el polímero, dichas transiciones son características de cada molécula, sin embargo, predomina la similitud con la molécula de Eudragit,

En cuanto a las NPs de Eudragit (Figura 25 C) se observó que el polímero presenta dos transiciones de fase importantes, en 72.8 y 153.2 °C, las cuales posiblemente corresponden a la Tg y a la disociación de los puentes de hidrógeno. Estos resultados difieren a lo reportado por Pool *et al.* (2012), quienes emplearon el mismo polímero (Eudragit) como material de pared, sin embargo, emplearon diferente activo, el cual también interfiere en el tamaño de partícula resultante.

Por otra parte, en las curvas de NPs cargadas con AE (Figura 25 D) y CI β -CD/AE (Figura 25 E), se observó que la Tg del polímero se desplaza a temperaturas menores, esto confirma las interacciones que surgen entre las moléculas, ya sea entre el Eudragit y el AE libre, así como el Eudragit con los CI β -CD/AE.

En las NPs cargadas el comportamiento térmico sugiere que el AE libre y los CI β -CD/AE se encuentran dispersos en la matriz polimérica en estado amorfo, y el cambio observado en la Tg del polímero, se debe a esas interacciones entre polímero/AE y polímero/CI β -CD/AE.

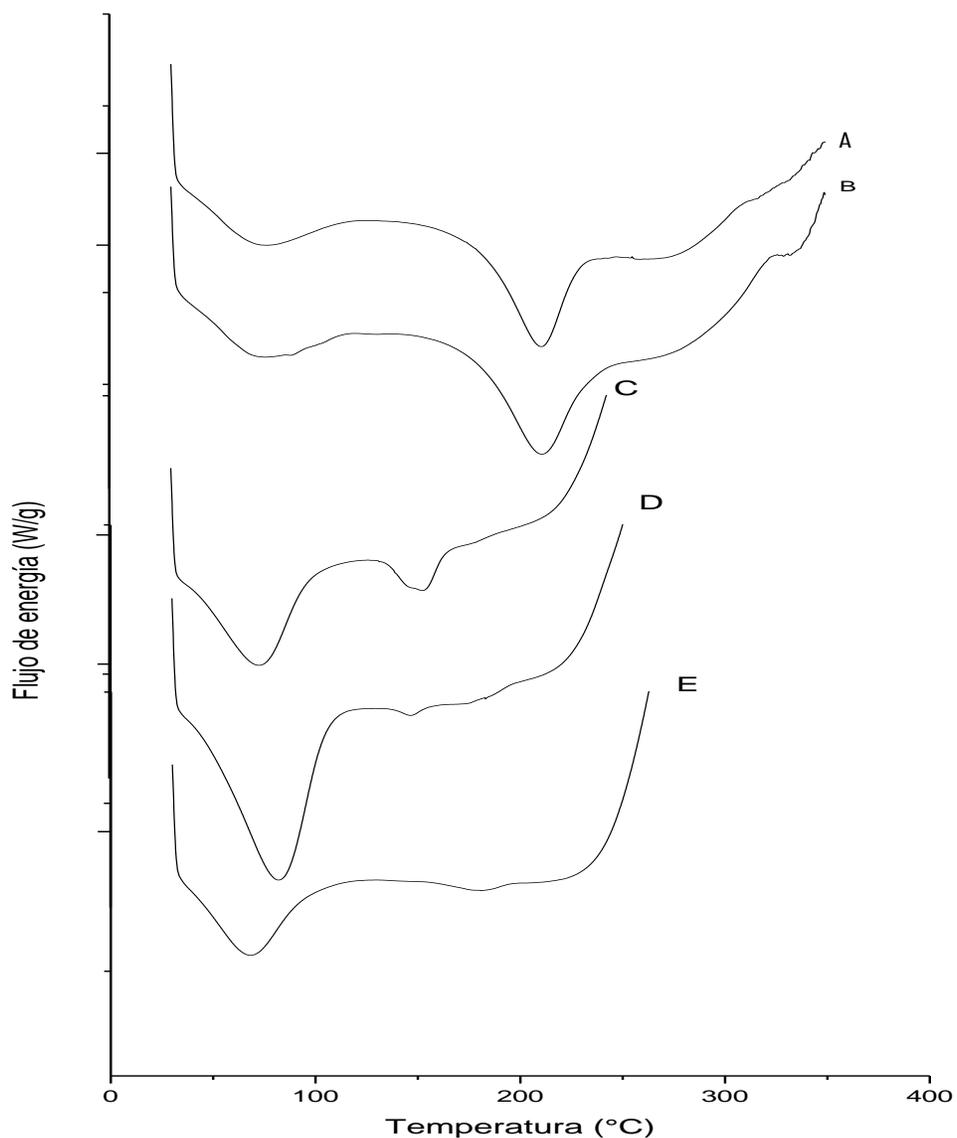


Figura 25. Termogramas para Eud (A), mezcla física CI β -CD-Eud (B), nanopartículas de Eud (C), nanopartículas AE/Eud (D) y nanopartículas CI β -CD/Eud (E).

7.9.4 Difracción de Rayos X

Esta técnica se empleó para evaluar el estado físico en que se encontraban los CI β -CD/AE dentro de las NPs, confirmando los resultados obtenidos en DSC. En la Figura 26 se muestran los patrones de difracción de

rayos X para Eudragit, mezcla física entre CI β -CD/AE y Eudragit, NPs placebo, NPs AE libre y NPs de CI β -CD/AE.

El Eudragit presentó un estado amorfo, el cual ha sido reportado por algunos autores, los cuales mencionan que el Eudragit es de naturaleza amorfa (De Oliveira *et al.*, 2009). En la mezcla física Eud- CI β -CD/AE (Figura 26 B) se observaron los patrones de difracción de ambos componentes, donde se presentaron algunos cambios en los patrones de difracción, lo cual sugiere la presencia de interacciones entre el polímero y los CI β -CD/AE. El patrón de difracción de las NPs cargadas con AE (Figura 26 D) difiere del patrón de las NPs placebo (Figura 26 C), lo cual significa la presencia de interacciones entre el polímero y el aceite. Por otra parte el patrón de las NPs cargadas con los CI β -CD/AE muestra algunos picos característicos de los CI β -CD/AE, esto sugiere que la muestra contenía una pequeña cantidad de cristales de los CI β -CD/AE dispersos en la matriz polimérica de las NPs.

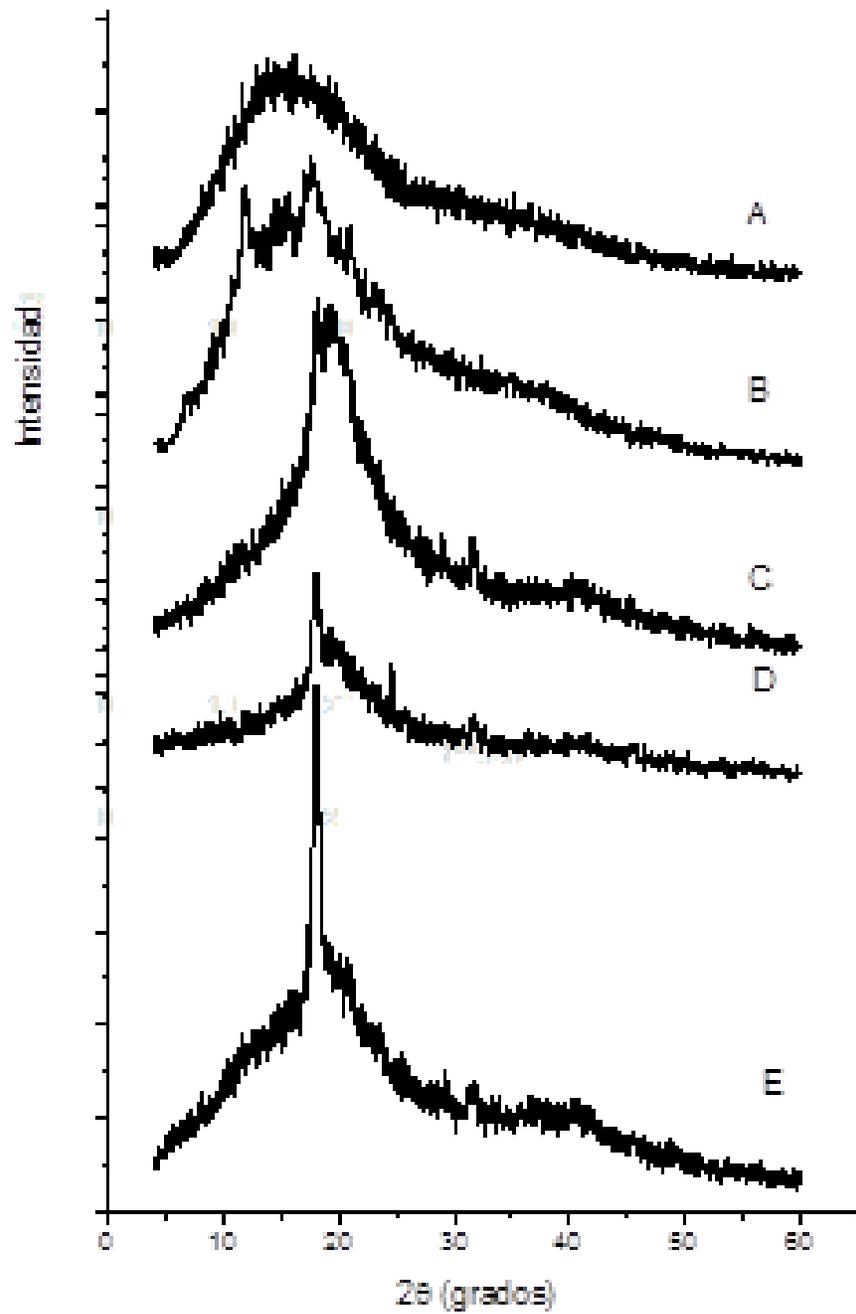


Figura 26. Difractogramas de Rayos X para Eud (A), mezcla física CI β -CD/AE y Eud (B), nanopartículas de Eud (C), nanopartículas Eud/AE (D) y nanopartículas Eud/CI β -CD/AE (E)

7.9.5 Cinéticas de liberación

En la Figura 27, se muestra la cinética de liberación del aceite esencial de las NPs cargadas con los complejos de inclusión de β -CD a diferentes pHs (2, 4.5 y 7.2). Se observó que a pH 7.2 la liberación fue mucho más rápida, donde en las primeras horas la liberación fue del 50%, mientras que al cabo de la cinética, la liberación fue de casi el 80% aproximadamente. Caso contrario en los complejos de inclusión, donde a este pH la liberación fue más lenta que a pHs ácidos. Por otra parte, para los pH 2 y 4.5, se observó un fenómeno interesante, es decir, en los primeros minutos la liberación a pH 4.5 fue mayor, sin embargo, conforme transcurrió el tiempo se invirtió este fenómeno, resultando mayor a pH 2; esto puede deberse a las interacciones entre los CI β -CD y el Eudragit, donde posiblemente al combinarse, el porcentaje de liberación se va a un porcentaje intermedio, es decir, como los complejos de inclusión se liberan más rápido a pH 2 y las NPs a 7.2, al estar interaccionando la liberación es mayor a pH 4.5 que a pH 2.

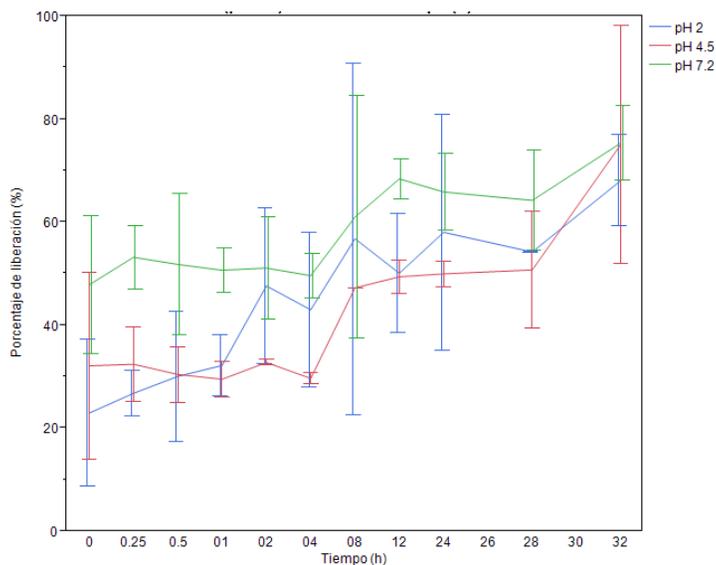


Figura 27. Cinéticas de liberación de AE desde NPs con CI β -CD en solución amortiguadora Sörensen a pH 2, 4.5 y 7.2, durante 32 h. Resultados expresados como la media \pm desviación estándar de tres repeticiones con dos réplicas.

7.9.6 Capacidad Antioxidante

En la doble encapsulación, la capacidad antioxidante se evaluó empleando el método de ABTS y VDP.

7.9.6.1 Método ABTS

En la Figura 28, se muestra la cinética del AE libre, CI β -CD/AE (90:10), NPs cargadas con AE y NPs cargadas con CI β -CD/AE a pH 2 (a), pH 4.5 (b) y pH 7.2 (c).

Se observa que la capacidad antioxidante está en función del pH, resultando mayor a pH 7.2 para todos los tratamientos. Para el AE libre a pH 2 (Figura 28 a), se observó que conforme transcurrió el tiempo la capacidad antioxidante fue incrementando, este mismo comportamiento también se observó para los CI β -CD/AE; sin embargo, la capacidad antioxidante de éstos últimos siempre fue superior a la del AE mismo; de tal forma, que los complejos protegen al AE reflejándose en una capacidad antioxidante mayor. En el caso de las NPs cargadas con AE libre, hasta el minuto 10 se observó el incremento de la capacidad antioxidante, estando muy por debajo de la que se presenta en el AE libre y los CI β -CD/AE; mientras que en las NPs cargadas con CI β -CD/AE, no se observa esa capacidad antioxidante sino hasta el minuto 30 en adelante, siendo menor que la que presentan todos los tratamientos, esto puede deberse a que al tratarse de una doble encapsulación el activo se libera más lento. Para el pH 4.5 (Figura 28 b), el comportamiento fue distinto, es decir, hasta el minuto 6 la capacidad antioxidante del AE libre fue mayor que la de todos los tratamientos, a partir de este tiempo los CI β -CD/AE superaron al AE. En cuanto a las NPs, se observó que la capacidad antioxidante fue mayor que la que se presentó a pH 2. Sin embargo, sigue siendo muy baja respecto a la que se presenta en el AE libre y los CI β -CD/AE. Por otra parte, la capacidad antioxidante se ve favorecida a pH 7.2 (Figura 28 c) para todos los casos, este mecanismo se ve reflejado en el AE libre, en el cual los valores de μ moles equivalente de trolox/mg obtenidos fueron constantes durante el tiempo de evaluación. A partir del minuto 60, los CI β -CD/AE

no sólo conservaron la capacidad antioxidante del AE, sino que la mejoraron. En las NPs, se observó un comportamiento muy interesante, ya que al minuto 90, la capacidad antioxidante es casi similar que la del AE y los CI β -CD/AE. Dicho comportamiento, probablemente se debe a que los CI β -CD/AE se tienen que liberar de las NPs, siendo un mecanismo lento, además se sugiere que la capacidad antioxidante está en función del pH.

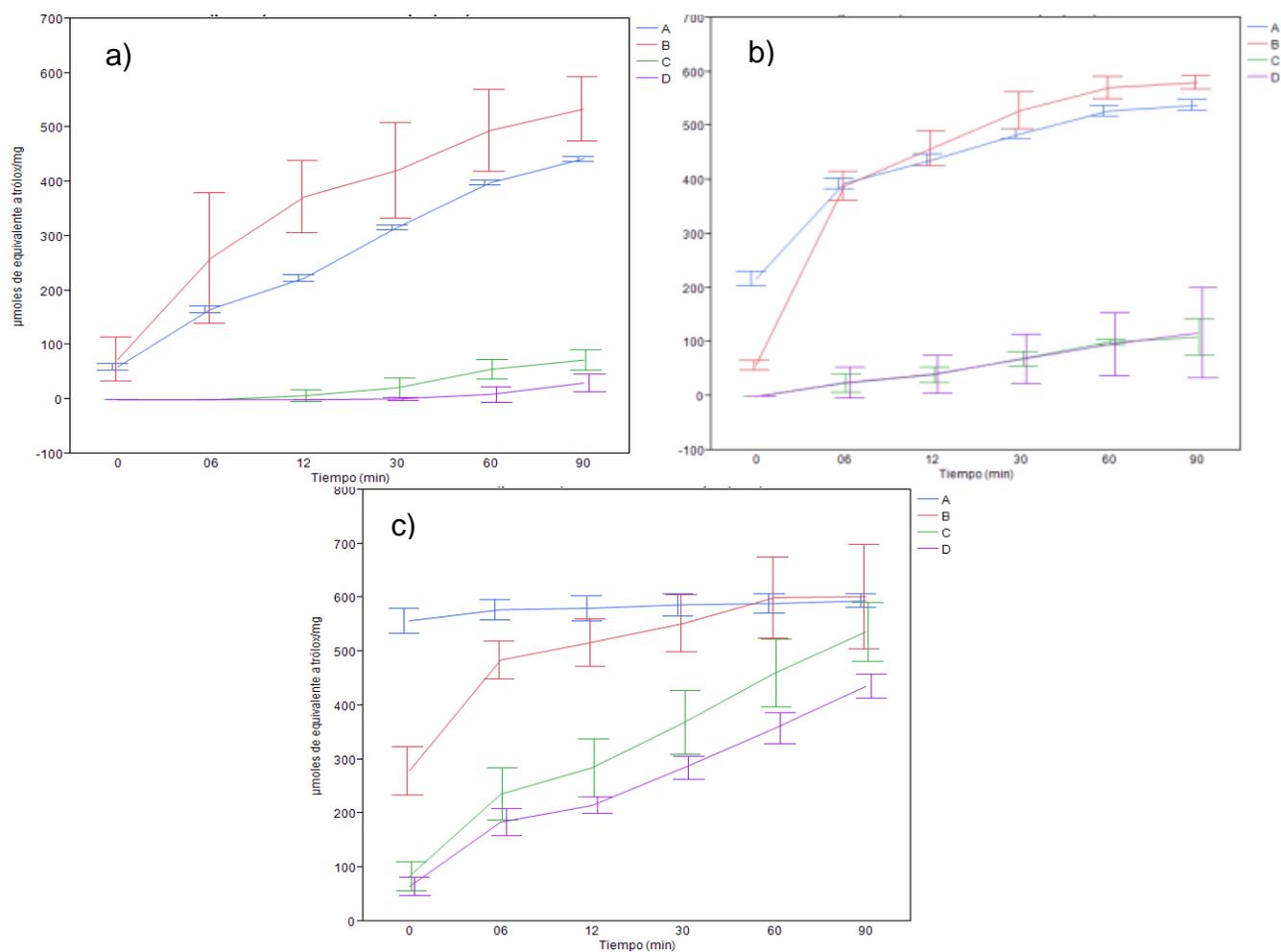


Figura 28. Cinética de capacidad antioxidante de aceite esencial libre (A), CI β -CD/AE (B), NPs Eud/AE (C) y NPs Eud/CI β -CD/AE (D) a pH 2 (a), pH 4.5 (b) y pH 7.2 (c) por el método ABTS durante 90 min.

7.9.6.2 Método VDP

En la Figura 29 y en el Cuadro 9, se presentan los voltamperogramas diferenciales de pulso y los potenciales de oxidación de las NPs cargadas con AE y las NPs cargadas con CI β -CD/AE (proporción 90:10). El análisis de varianza para la capacidad antioxidante de las NPs de AE mostró diferencias significativas, no así para las NPs cargadas con los complejos de inclusión. En las primeras, se observó que conforme incrementa el pH al minuto cero, los potenciales de oxidación son desplazados hacia potenciales más positivos, esto significa que a valores de pH básicos disminuyó la capacidad antioxidante. Sin embargo, en el caso de las NPs cargadas con CI β -CD/AE sucedió lo contrario, conforme incrementó el pH los potenciales de oxidación se desplazaron hacia potenciales menos positivos, lo que se traduce que a pHs básicos aumenta la capacidad antioxidante. Según algunos autores (González *et al.* 2011), esto se debe a que el potencial depende de la concentración de protones, cuando el pH cambia, también el analito de estudio es transformado encontrándose en diferentes estados de protonación los cuales son también electroactivos pero a un potencial muy diferente. Por lo tanto, una menor concentración de protones genera una disminución en el potencial de oxidación.

Cuadro 9. Potenciales de pico detectados en VDP para las NPs Eud/AE y NPs Eud/CI- β -CD/AE

| pH | NPs Eud/AE (mV) | NPs Eud/ CI β-CD/AE (mV) |
|-----------|-------------------------------|--|
| 2 | 799 \pm 8.2 ^b | 818.8 \pm 28.6 ^a |
| 4.5 | 815 \pm 10.4 ^b | 814 \pm 6.3 ^a |
| 7.2 | 868.5 \pm 10.4 ^a | 754 \pm 114.9 ^a |

Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes por duplicado. Datos expresados como la media \pm desviación estándar. Valores con diferente letra indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) (prueba de Tukey).

En el voltamperograma diferencial de pulso (Figura 29), se observa que las señales de oxidación no están bien definidas, donde prácticamente desaparecen, probablemente se deba a que a dichos valores de pH, la forma electroactiva se convierte en dominante, es decir que el analito se protone o desprotone dando como resultado el desvanecimiento de los picos.

Comparando los resultados de capacidad antioxidante obtenidos con VDP y los obtenidos con el método ABTS, se encontró que al pH mayor (7.2) se presentó una mayor capacidad antioxidante correspondiendo con un potencial de oxidación desplazado hacia potenciales menos positivos.

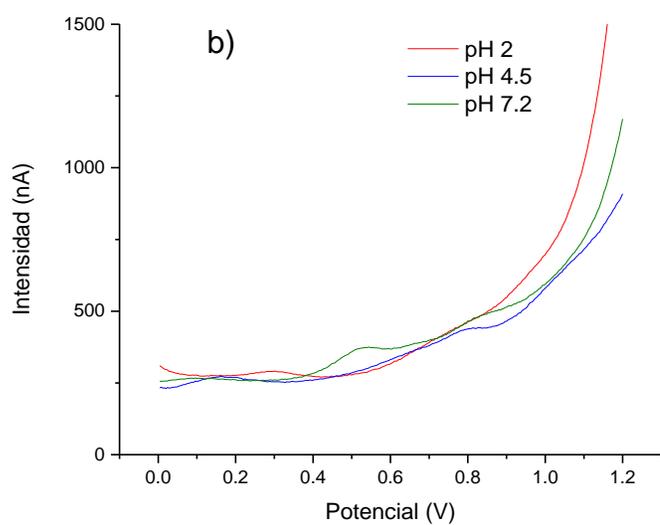
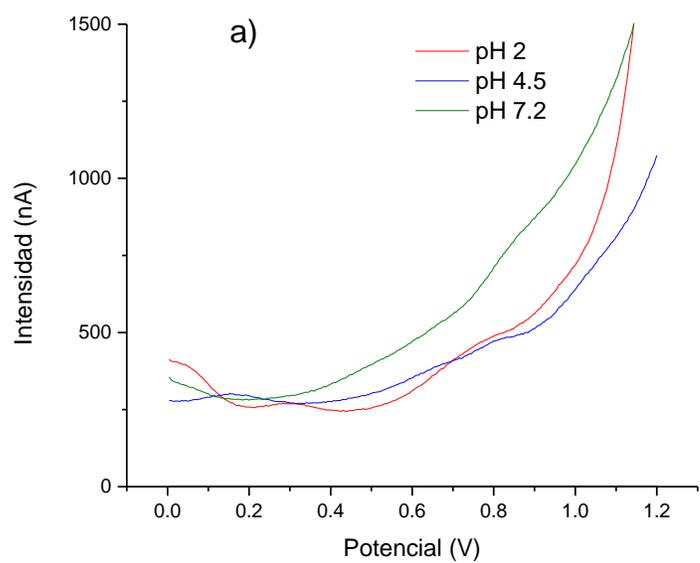


Figura 29. Voltamperograma Diferencial de Pulso de NPs eud/AE (a) y NPs eud/CI-β-CD/AE (b) a pH 2, 4.5 y 7.2.

8 CONCLUSIONES

Se logró la caracterización fisicoquímica tanto de los complejos de inclusión como de las nanopartículas cargadas con los complejos. La calorimetría diferencial de barrido y los estudios electroquímicos confirmaron la formación de los complejos y las NPs. Las propiedades antioxidantes del aceite se mantienen aún después de la encapsulación, tanto en los complejos de inclusión como en la doble encapsulación, además se observó una mayor capacidad antioxidante conforme incrementa el pH. Se confirmó que la liberación del aceite esencial de orégano depende del pH en el que se encuentra el medio.

Estos resultados sugieren que este sistema de liberación controlada puede ser empleado para la encapsulación de compuestos bioactivos altamente sensibles dentro de productos alimentarios, y la formulación de alimentos funcionales y de cierta manera alargar la vida de anaquel, ya que protegen al activo.

Por otra parte, los resultados obtenidos tienen suma importancia para el diseño de nuevos sistemas de encapsulación y liberación controlada de compuestos como el aceite esencial, el cual contiene compuestos bioactivos como antioxidantes, los cuales tienen propiedades benéficas para la salud.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Arana-Sánchez, A., Estarrón-Espinosa, M., Obledo-Vázquez, E. N., Padilla-Camberos, E., Silva-Vázquez, R., Lugo-Cervantes, E. 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican organo essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in b-cyclodextrin. The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology 50, 585–590
- Arango B, O., Pantoja D, D., Santacruz CH., L., Hurtado B. A.M. 2012. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K) del Alto Patía. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 10 (2), 79-86.
- Astray G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R. Simal-Gandara, J. 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. Food hydrocoloides. 23, 1631–1640.
- Ávila Ramos, F., Pro Martínez, A., Sosa Montes, E., Cuca García, J.M., Becerril Pérez, C. M., Figueroa Velasco, J. L., Narciso Gaytán, C. 2011. Effects of dietary oregano essential oil and vitamin E on the lipid oxidation stability of cooked chicken breast meat. Poultry Science. 91 (2), 505-11.
- Aydin S., Basara A. A., Basaran N. 2005. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. Mutat Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 581, 43– 53.
- Barba A. A. Amore, M. Chirico, S. Lamberti, G. Titomanlio, G. 2009. A general code to predict the drug release kinetics from different shaped matrices. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 36 (2-3), 359-368.
- Lira de Sa Barreto, L. C. 2009. Utilidad de algunos copolímeros acrílicos para el control de liberación de fármacos en pelets matriciales elaborados por extrusión-esferonización. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela: Servicios de Publicaciones e Intercambio Científico. Pág. 5-6

- Baydar H., Sagdic O., Ozkan G., Karadogan T. 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*. 15, 169–172.
- Bei D., Meng J., Youan B. B. C. 2010. Engineering Nanomedicines for Improved Melanoma Therapy: Progress and Promises. *Nanomedicine*. 5 (9),1385-1399.
- Brigger I., Dubernet C., Couvreur P. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54, 631–651.
- Burt S. A., Zee R., Koets A. P., Graaff A. M., Knapen F., Gaastra W., Haagsman H. P., Veldhuizen E. J. A. 2007. Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and environmental microbiology*. 73, 4484–4490.
- Calabró M. L., Tommasini, S., Donato, P., Raneri, D., Stancanelli, R., Ficarra, P., Ficarra, P., Costa, C., Catania, S., Rustichelli, C., Gamberini, G. 2004. Effects of α - and β -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 35, 365–377.
- Carocho M., Ferreira I. C. F. R. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51, 15–25.
- Chai X., Lin R., Wu K., Li S. 2011. Characterization of β -Cyclodextrin-Thymol Inclusion Complexes. *Advanced Materials Research*. 233, 1766-1773.
- Choi M. J., Ruktanonchai U., Soottitantawat A., Min S. G. 2009. Morphological characterization of encapsulated fish oil with β -cyclodextrin and polycaprolactone. *Food Research International*. 49, 989–997.
- Cortés Hernández H. F., Martínez Yepes, P. N. Albeiro Valencia H. 2006. *Fundamentos de cristalografía*. Elizcom. Pág. 83.

- Couvreur, P., Barratt, G., Fattal, E., Legrand, P., Vauthier, C. 2002. Nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 19 (2), 99-134.
- Da Rocha F. F., Barros V. L., Catarí R. E.L, Salles T. M. T., Olea A. C., Pérez C. F., Caxico A. F, Fonseca G. M. O. 2013. Antioxidant activity of the mangiferin inclusion complex with β -cyclodextrin. *Food Science and Technology*. 51, 129-134.
- Dar, R.A., *et al.*, Evaluation of antioxidant activity of crocin, podophyllotoxin and kaempferol by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Arabian Journal of Chemistry* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.004>
- Del Toro-Sánchez C. L. Ayala-Zavala J. F. Machi L. Santacruz H. Villegas-Ochoa M. A. Alvarez-Parrilla E. González-Aguilar G. A. 2010. Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from β -cyclodextrin capsules. *Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry*. 67, 431–441.
- Del Valle, E. M. 2003. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. 39 (9), 1033–1046.
- De Oliveira H.P., Tavares G.F., Nogueiras C., Rieumont J. 2009. Physico-chemical analysis of metronidazole encapsulation processes in Eudragit copolymers and their blending with amphiphilic block copolymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 380, 55–61.
- Di Majo D., La Neve, L., La Guardia, M., Casuccio, A., Giammanco, M. 2011. The influence of two different pH levels on the antioxidant properties of flavonols, flavan-3-ols, phenolic acids and aldehyde compounds analysed in synthetic wine and in a phosphate buffer. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24, 265–269.

- Flores Rivera, E. 2009. Potencial productivo del orégano (*Lippia graveolens* HBK.) y calidad de su aceite esencial en dos localidades del Mezquital, Dgo. Instituto Politécnico Nacional. Secretaría de Investigación y Posgrado. Pág. 16.
- González Fuentes, F. J. 2009. Determinación de la capacidad antioxidante y características estructurales de metabolitos secundarios de extractos polares y aceite esencial del orégano mexicano (*Lippia graveolens*) mediante la técnica de voltamperometría diferencial de pulso. UAQ. pp. 97
- González Fuentes, F. J. López Gil, M. A. Mendoza S. Escarpa Q. 2011. Electrochemical Screening of Biomarkers in Chemotype Mexican Oregano Oils on Single-Walled Carbon Nanotubes Screen-Printed Electrodes. *Electroanalysis*. 23 (9), 2212 – 2216.
- González Güereca, M. C., Soto Hernández, M., Kite G., Martínez Vázquez, M. 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30 (1), 43 – 49.
- Hao S., Wang B., Wang Y., Zhu L., Wang B., Guo T. 2013. Preparation of Eudragit L 100-55 enteric nanoparticles by a novel emulsion diffusion method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 108, 127– 133.
- Hashimoto H. 2002. Present Status of Industrial Application of Cyclodextrins in Japan. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 44, 57– 62.
- He J., Zhong C., Mi J. 2005. Modeling of Drug Release from Bioerodible Polymer Matrices. *Drug Delivery*. 12, 251-259.
- Hernández Albañil, H. 2002. *Mecánica de fractura y análisis de falla*. Universidad Nacional de Colombia. Primera edición. Pág. 238.

- Karathanos V, T., Mourtzinou L., Yannakopoulou K., Andrikopoulos N. K. 2007. Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin. *Food Chemistry*. 101, 652–658.
- Kayaci F., Uyar T. 2012. Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanoweb: Prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin. *Food Chemistry*. 133, 641–649.
- Koontz J. L., Marcy J. E., O’Keefe S. F., Duncan S. E. 2009. Cyclodextrin Inclusion Complex Formation and Solid-State Characterization of the Natural Antioxidants α -Tocopherol and Quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(4), 1162–1171.
- Krishnaiah D., Sarbatly R., Nithyanandam R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*. 8 (9), 217–233.
- Lao L. L., Peppas N. A., Boey F. Y. C., Venkatraman S. S. 2011. Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 418 (1), 28-41.
- Letchford K. & Burt H. 2007. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 65, 259–269.
- Lin L. Z., Mukhopadhyay S., Robbins R. J., Harnly J. M. 2007. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 361–369.

- López C. A. F. Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de Yerba mate. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos. 93-94.
- Mantell C. L. 1980. Ingeniería Electroquímica. Reverté, S. A. 3 p.
- Martínez M. A., Ballesteros M., Del Castillo B. 1985. The influence of solvent polarity and viscosity on fluorescence of quinolizinium salts. *Analytica Chimica Acta*. 170, 95-100.
- Miguel M.G., Dandlen S.A., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Barroso, J.G., Marques M.H. 2009. Comparative evaluation of the antioxidant activities of thymol and carvacrol and the corresponding β -cyclodextrin complexes. *Acta Horticulturae*. 853, 363-368.
- Miyazawa I., Ueda H., Nagase H., Endo T., Kobayashi S., Nagai T. 1995. Physicochemical properties and inclusion complex formation of δ -cyclodextrin *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 3, 153–162.
- Mora L., Chumbimuni-Torres K. Y., Clawson C., Hernandez L., Zhang, L., Wang J. 2009. Real-time electrochemical monitoring of drug release from therapeutic nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 140, 69–73.
- Mourtzinis I., Kalogeropoulos N., Papadakis S. E., Konstantinou K., Karathanos V. T. 2008. Encapsulation of Nutraceutical Monoterpenes in β -Cyclodextrin and Modified Starch *Journal of Food Science*. 73, 1750-3841.
- Mura P. 2014. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 101, 238-250.
- Nakatani N. 2000. Phenolic antioxidants from herbs and spices. *Biofactors*. 13, 141–146.

- Nenadis N., Wang L. F., Tsimidou M., Zhang H. Y. 2004. Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS•+ Assay. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 52, 4669-4674.
- Nedovic V., Kalusevic A., Manojlovic V., Levic S., Bugarski B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* 1, 1806 – 1815.
- Oxford University Press. 1997. Química. Oxford. Primera edición. Pág. 182-182.
- Pastor M., Esquisabel A., Talavera A., Año G., Fernández S., Cedrec B., Infante J. F., Callicó A., Pedraz J.L. 2013. An approach to a cold chain free oral cholera vaccine: in vitro and in vivo characterization of *Vibrio cholerae* gastro-resistant microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 448, 247–258.
- Peppas N. A., Khare, A. R. 1993. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 11 (1-2), 1-35.
- Petrović G. M., Stojanović G. S., Radulović N. S. 2010. Encapsulation of cinnamon oil in β -cyclodextrin. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4 (14), 1382-1390.
- Peggy A., Ponce C., Buera M. P., Elizalde B. E. 2010. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. *Journal of Food Engineering*. 99, 70–75.
- Pitchford P. 2007. *Sanando con alimentos integrales: tradiciones asiáticas y nutrición moderna*. North Atlantic Books. Pág. 803
- Polyakov N.E., Leshina T., Konovalova T.A., Hand E.O., Kispert L.D. 2004. Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: ^1h nmr, epr, and optical studies. *Free Radical Biology & Medicine*. 36, 872–80.

- Pool H., Quintanar D., Figueroa J., Bechara J. E. H., McClements D. J., Mendoza S. 2012. Polymeric Nanoparticles as Oral Delivery Systems for Encapsulation and Release of Polyphenolic Compounds: Impact on Quercetin Antioxidant Activity & Bioaccessibility. *Food Biophysics*. 7, 276–288.
- Prior R. L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 4290–4302.
- Quert A. R., Miranda M., Leyva C. B., García C, H., Gelabert A. F. 2001. Rendimiento de aceite esencial en *Pinus caribaea* MorElet según el secado al sol y a la sombra. III. *Revista Cubana de Farmacia*. 35 (1), 47-50.
- Salgueiro R. L., Cavaleiro C., Goncalves M. J., Proenca da Cunha A., 2003 Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia Graveolens* from Guatemala. *Planta Médica*. 69, 80-83
- Sánchez Ó, Medellín R., Aldama A., Goettsch B., Soberón J. y Tambutti M. 2007. Método de evaluación del riesgo de extinción de las especies silvestres en México (MER). UNAM. Pág. 104-105.
- Sáez V., Hernández V., Sanz L. 2004. Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 5, 87-101.
- Schrooyen P.M.M., Van Der Meer, De Kruif C. G. 2001. *Proceedings of the Nutrition Society*. 60, 475–6.
- Silva V. R. & Dunford N. T. 2005. Bioactive Components of Mexican Oregano Oil as Affected by Moisture and Plant Maturity, *Journal of Essential Oil Research*. 17, 668-671.
- Siepmann J. & Siepmann F. 2012. Modeling of diffusion controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 161 (2), 351-362.

- Singh R., Bharti N., Madan J., Hiremath S. N. 2010. Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes– A Review. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2 (3), 171-183.
- Suriñach S., Baro M. D., Bordas S., Clavaguera N., Clavaguera-Mora M. T., 1992. La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. 31 (1), 11-17.
- Szente L. & Szejtli L. 2004. Cyclodextrins as food ingredientsTrends. *Trends in Food Science & Technology*. 15, 137–42.
- Szejtli J. 1998. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical Reviews*. 98, 1743–1753.
- Wandrey C., Bartkowiak A., Stephen E., Harding E. 2010. Materials for Encapsulation. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. 1(3), 31-100.
- Yih T.C. & Al-Fandi M. 2006. Engineered Nanoparticles as Precise Drug Delivery Systems. *Journal of Cellular Biochemistry*. 97, 1184–1190.
- Zhao J., Gao T., Yan Y., Chen G., Li G. 2013. Probing into the interaction of β -amyloid peptides with bilayer lipid membrane by electrochemical techniques. *Electrochemistry Communications*. 30, 26–28.
- Zhang Y., Wu X., Meng L., Zhang Y., Ai R., Qi N., He H., Xu H., Tang X. 2012. Thiolated Eudragit nanoparticles for oral insulin delivery: Preparation, characterization and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 436, 341– 350.

10 APÉNDICE

Cuadro 10. Abreviaturas

| | |
|----------------|---|
| AE | Aceite esencial |
| CD | Ciclodextrinas |
| CI β -CD | Complejos de inclusión con β - ciclodextrinas |
| NPs | Nanopartículas |
| VDP | Voltamperometría Diferencial de Pulso |
| XRD | Difracción de rayos X |
| EE | Eficiencia de encapsulación |
| DSC | Calorimetría Diferencial de Barrido |
| SEM | Microscopía Electrónica de Barrido |
| GRAS | Generalmente Reconocidos Como Seguro |
| JECFA | Evaluación de los riesgos asociados con las sustancias químicas |

: